

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**



**TESIS DOCTORAL**

**Diseño, caracterización y evaluación biológica de diferentes nano-  
micropartículas poliméricas como sistemas de liberación controlada de  
tamoxifeno**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Ana María Fernández Olleros**

Directores

María Dolores Blanco Gaitán  
Rafael Lozano Fernández

**Madrid, 2016**

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



DISEÑO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE DIFERENTES  
NANO/MICROPARTICULAS POLIMÉRICAS COMO SISTEMAS DE LIBERACIÓN  
CONTROLADA DE TAMOXIFENO

**ANA MARÍA FERNÁNDEZ OLLEROS**

MADRID, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID



# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

## FACULTAD DE FARMACIA



### DISEÑO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE DIFERENTES NANO/MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COMO SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE TAMOXIFENO

Memoria presentada por:

**ANA MARÍA FERNÁNDEZ OLLEROS**

para la obtención del grado de Doctor

Vº Bº

Directores:

Firma manuscrita en azul de la Dra. Dña. María Dolores Blanco Gaitán.

Dra. Dña. María Dolores Blanco Gaitán.

Firma manuscrita en azul del Dr. D. Rafael Lozano Fernández.

Dr. D. Rafael Lozano Fernández

**Madrid, 2015**





**Dra. Dña. MARÍA DOLORES BLANCO GAITÁN**, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y **Dr. D. RAFAEL LOZANO FERNÁNDEZ**, Catedrático del Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICAN: Que el presente trabajo titulado: " preparación, caracterización y evaluación biológica de nano/micropartículas basadas en poliésteres alifáticos como sistemas de liberación controlada de tamoxifeno", llevado a cabo por Dña. **ANA MARÍA FERNÁNDEZ OLLEROS**, ha sido realizado bajo nuestra dirección.

Creemos que el mencionado Trabajo reúne las características necesarias para ser defendido ante un Tribunal para la obtención del Grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda, firmamos el presente certificado en Madrid a 25 de Mayo de 2015.



Fdo:

Dra. Dña. María Dolores Blanco Gaitán



Fdo:

Dr. D. Rafael Lozano Fernández



***A MI MADRE***



*En primer lugar quisiera agradecer sinceramente a mis directores por haber llevado a buen término este trabajo. A la Dra. Dña. María Dolores Blanco por su gran dedicación, su increíble y gran involucración, tanto profesional como personalmente. De ella he aprendido la importancia de la perseverancia y el trabajo bien hecho y que al final todo se puede conseguir. Al Dr. Don Rafael Lozano Fernandez por su asesoramiento, su calidad humana y su gran capacidad de trabajo, del cual he aprendido un montón con cada consejo que me ha proporcionado. El apoyo que ambos me han dado y su acogida en el grupo de investigación de materiales poliméricos para la liberación controlada de compuestos bioactivos en biomedicina han permitido que me desarrolle como investigadora y como persona.*

*Al Dr. José María Teijón Rivera, Excelentísimo Señor Académico, por haberme permitido realizar este trabajo en el laboratorio que dirige, por su humanidad y su apoyo durante el desarrollo del mismo. Sus buenas palabras en el laboratorio, siempre me han animado.*

*A la Dra. Dña. Irene Iglesias, su tremenda disponibilidad y cariño, por sus consejos y apoyo y por siempre tener la puerta abierta para atenderme a cualquier momento, por confiar en mí e introducirme en el grupo de investigación. Agradecer a la Dra. Dña. Enriqueta Muñiz y su equipo, su colaboración con los estudios de histología, aprendí el manejo de tejidos, fijación y las diferentes técnicas de tinción que me han permitido obtener las imágenes presentadas en este trabajo.*

*A todos mis compañeros del laboratorio; Sandra, Marta, Ana, Elena, Nuria, César, Rosa, que me han ayudado, apoyado y con los que he pasado momentos muy agradables. Han compartido conmigo, además del material, ideas, risas y momentos inolvidables. Sandra mi mentora con la atomización y secado, Marta mi mentora con los cultivos celulares, Elena y nuestros nanogeles, Ana experta en polímeros naturales, Nuria la última adquisición con su doxorubicina, Cesar y Rosa que siempre me han ofrecido sus conocimientos, experiencia y sus buenos consejos incluso han echado manos siempre que lo he necesitado. Todos ellos han hecho aportaciones valiosas a este trabajo, a todos vosotros, gracias.*

*Agradecer la gran oportunidad que me brindó el Dr. Don Nicholas Peppas, el cual me abrió las puertas de su laboratorio en Austin, Texas, y me acogió como una más de su equipo, permitiéndome adquirir grandes conocimiento del mundo de los nanohidrogeles. Agradecer también al Dr. Don Issa Katime su acogida en su laboratorio en Bilbao, el cual me sumergió en el campo de la síntesis de nuevos monómeros y el mundo NIPA. Estas estancias me han*

*permitido mejorar mis conocimientos y desarrollar competencias nuevas que me han permitido profundizar en los objetivos buscados con este trabajo.*

*A mis nuevos compañeros: Begoña, Maria, Las Olgas, Raquel, Elisa, Enrique, Jesús, Dani, Guillermo... y todos a aquellos con los que comparto el día a día de trabajo, que siempre han mostrado un gran compañerismo, apoyo y confianza en mí y de los cuales sigo aprendiendo un montón.*

*A mis amigos, que no nombro por no olvidarme de ninguno, por su apoyo, ánimo y las fuerzas que me han transmitido.*

*A mi familia, que me ha aconsejado en cada decisión y me han animado incondicionalmente. El gran apoyo que siempre recibo de ellos y su cariño me han permitido levantarme en los momentos más duros, dándome la fuerza a continuar y afrontar cada proyecto nuevo. Siempre han estado ahí y sé que siempre puedo contar con todos ellos. Un especial agradecimiento a Alejandro, gran persona y apoyo fundamental que me ha motivado a seguir y finalizar esta etapa tan importante de mi vida. Gracias por sacar siempre lo mejor de mí.*

*Y como siempre, a mi madre, luchadora innata, que a pesar de los años sigo teniendo presente en cada día y cada paso de mi vida, gracias a ella, a su esfuerzo y a sus enseñanzas he llegado a ser la persona que soy hoy. Ella me transmitió que en esta vida, aunque no siempre se gana, siempre merece la pena luchar con la mejor de las intenciones.*

## **ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS**

%p	Porcentaje en peso
2AAECM	2-acril amido etil carbamato
4 AMP	4 amino metil piridina
4OH-TMX	4 hidroxí tamoxifeno
AAm	Acrilamida
AB%	Biodisponibilidad absoluta
ACT	Acetona
ALT/GPT	Alanina aminotransferasa
ANOVA	Análisis de la varianza
AST/GOT	Aspartato aminotransferasa
AUC	Área bajo la curva de la concentración plasmática versus tiempo
AUMC	Área bajo la curva de la concentración plasmática versus tiempo en el momento cero y en el primer momento
BOC	Di- <i>tert</i> -butil dicarbonato
ClAc	Cloruro de acrilóilo
CMM	Concentración mínima micelar
CRT	Creatina
DCC	N,N'-Diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DLS	Difusión de la luz cuasielástica
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (medio de cultivo celular)
DMSO	Dimetil sulfóxido
Dn	Diámetro promedio en número
DTG	Derivadas termogravimétricas
Dw	Diámetro promedio en peso
E	Sistemas sintetizados por emulsión
EDAC	Hidrocloreuro de 1-(3- dimetilaminopropil-3-etilcarbodiimida
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EMA	European Medicine Agency
EPR	Efecto del incremento de la permeabilidad y retención
ERK2	Quinasas reguladas por señales extracelulares
EtOH	Etanol absoluto
FBS	Suero fetal bovino
FCO	Fármaco
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FOL	Fólico
FTIR	Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier
HeLa	Línea celular de carcinoma de cérvix
HER	Human epidermal receptor
HPLC	Cromatografía Líquida de alta eficacia
<sup>1</sup> H-RMN	Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Protones
Ke	Constante de eliminación



LCST	Temperatura de solución crítica inferior (lower critical solution temperature)
LDH	Lactato deshidrogenasa
MAPKs	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MCF7	Línea celular de carcinoma de mama humano
MDR	Resistencia múltiple a fármacos
MR	Metabolito ratio
MRT	Tiempo medio de residencia del fármaco
MS	Microesfera
MS-TMX	Microesferas con Tamoxifeno incorporado
MTT	Método de metiltiazoletetrazolium
NG	Nanohidrogel
NG-F	Nanogeles funcionalizados con ácido fólico
NG-TMX	Nanohidrogel con Tamoxifeno incorporado
NHS	N-Hidroxisuccinimida
NIPA	N-isopropilacrilamida
NMBA	N,N-metilénbisacrilamida
NP	Nanopartículas
NPAM	N-piridin acrilamida
NP-F	Nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico
NP-TMX	Nanopartículas con Tamoxifeno incorporado
OROS	Sistemas osmóticos de liberación oral
PBS	Tampón fosfato salino
PEG	Polietilen glicol
P-gp	Glicoproteína P
PLA	Poli (D,L-láctico)
PLGA	Poli(Láctico-co-Glicólico)
PLGA-PEG-FOL	Copolímero formado por poli (Láctico-co-Glicólico), polietilen glicol y ácido Fólico
PVA	Poli vinil alcohol
QELS	Dispersión de la luz quasielástica (Quasielastic light scattering)
RB%	Biodisponibilidad relativa
RE	Receptor de estrógenos
RES	Sistema fagocítico mononuclear
RF	Receptor de folato
S	Sistemas sintetizados por atomización y secado (spray dryer)
SDS	Dodecil sulfato sódico
SEM	Microscopio electrónico de Barrido
SERM	Fármacos moduladores selectivos de los receptores de estrógenos
SiRNA	RNA pequeño de interferencia (Small interfering RNA)
T47D	Línea celular de carcinoma de mama humano
TEA	Trietilamina
TEM	Microscopio electrónico de transmisión
TGA	Análisis termogravimétrico
TMX	Tamoxifeno
U	Índice de polidispersidad

## **ÍNDICE**



<b>ABSTRACT</b>	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	9
1.- SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA	11
1.1.- Micro/nanopartículas poliméricas	15
1.2.- Hidrogeles	20
1.3.- Vectorización	24
2.- BIOMATERIALES	28
2.1.- Biomateriales biodegradables	30
2.1.1.- Polímeros sintéticos	31
2.2.- Mecanismos de biodegradación de los polímeros	37
2.3.- Mecanismos de liberación de fármacos de los sistemas polimericos	39
2.4.- Biocompatibilidad	40
3.- APLICACIÓN DE LOS SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER	42
4.- TAMOXIFENO	48
<b>OBJETIVO</b>	53
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	57
1.- DISEÑO Y MÉTODOS DE SÍNTESIS	59
A. SÍNTESIS DE MICRO/NANOPARTÍCULAS BASADAS EN POLIÉSTERES ALIFÁTICOS	59
A.1.- Síntesis de microesferas por atomización y secado (spray drying)	59
A.2.- Síntesis de nanopartículas por emulsión/evaporación	63
A.2.1.- Síntesis de nanopartículas sin vectorizar	64
A.2.2.- Nanopartículas vectorizadas con fólico	66
B.- SÍNTESIS DE NANOHIIDROGELES	69
B.1.- Síntesis de monómeros	69
B.2.- Síntesis de nanohidrogeles no vectorizados	73
B.3.- Síntesis de nanogeles vectorizados con ácido fólico	76
B.4.- Incorporación del fármaco en los nanogeles	78
2.- CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS SISTEMAS	78
2.1.- Estudios morfológicos	78
2.2.- Determinación de la eficacia de incorporación del TMX	80
2.3.- HPLC	82
2.4.- Análisis termogravimétrico (TGA)	85
2.5.- Espectroscopía infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)	86

2.6.- Espectroscopía de resonancia magnética nuclear ( $^1\text{H}$ -RMN) .....	86
2.7.- Ensayo de liberación .....	87
2.8.- Modelos matemáticos .....	89
3.- ESTUDIOS EN CULTIVOS CELULARES .....	93
3.1.- Viabilidad celular y citocompatibilidad .....	96
3.2.- Incorporación celular de las partículas (uptake) .....	97
3.3.- Evaluación de la incorporación celular de las partículas mediante receptores de folato (uptake) .....	99
4.- ESTUDIOS <i>IN VIVO</i> .....	99
5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	107
<b>RESULTADOS</b> .....	109
1.- SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS MONÓMEROS Y COPOLÍMEROS .....	111
1.1.- Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) .....	112
1.2.- resonancia magnética nuclear de protones ( $^1\text{H}$ -RMN) .....	117
2.- SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS .....	118
2.1.- Microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM) .....	118
2.2.- Cuantificación del fólculo incorporado en las partículas vectorizadas .....	127
2.3.- Análisis termogravimétrico (TGA) .....	129
3.- CANTIDAD DE TAMOXIFENO INCORPORADO EN LOS SISTEMAS .....	135
4.- LIBERACIÓN DEL FÁRMACO DESDE LOS SISTEMAS .....	139
4.1.- Velocidades de liberación .....	144
5.- MODELOS MATEMÁTICOS .....	148
6.- ESTUDIOS CELULARES .....	154
6.1.- Estudio de viabilidad celular .....	154
6.2.- Estudios de internalización celular (uptake) .....	167
6.2.1.- Inhibición con fólculo .....	176
7.- CARACTERIZACIÓN <i>IN VIVO</i> .....	179
7.1.- Concentraciones plasmáticas alcanzadas tras la liberación <i>in vivo</i> .....	179
7.2.- Estudio farmacocinético .....	181
7.3.- Biocompatibilidad de los sistemas; histología en el lugar de inyección .....	183
7.4.- Biodistribución .....	184
7.5.- Índice organosomático (IOS) .....	185
7.6.- Estudio histológico en los órganos .....	186

<b>DISCUSIÓN</b>	189
1.- Micropartículas basadas en poliésteres sintetizadas por atomización y secado	191
2.- Nanopartículas sintetizadas por emulsión	211
3.- Nanohidrogeles sintetizados por polimerización radicalaria	226
<b>CONCLUSIONES</b>	239
<b>ANEXOS</b>	243
ANEXO I: Nomenclatura de los sistemas	245
ANEXO II: Distribución de tamaños	249
ANEXO III: Fotografías de los restos de sistemas después de la liberación in vitro	254
ANEXO IV: Parámetros Bioquímicos	256
ANEXO V: Concentración De partículas administradas en los estudios celulares	257
ANEXO VI: Artículos publicados	258
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	281



# **ABSTRACT**





## **ABSTRACT**

### **Introduction:**

Conventional drugs present good results in numerous pathologies, but in some cases, these dosage forms have serious limitations (limited solubility, low absorption and bioavailability of active pharmaceutical ingredient). Controlled release systems can improve these limitations and they also present a large number of advantages which make them indispensable for treatments of certain diseases such as cancer and diabetes among others. In these systems, the drug is released in a controlled manner at therapeutic concentrations and the release pattern can be established for certain periods of time. Among the multiparticulated controlled systems the nanoparticles and nanohydrogels, are taking an increasing interest due to their versatility in pharmaceutical applications and their properties, which provide numerous advantages. They can be made of different types of polymers from synthetic to natural polymers, which facilitate the modulation of characteristics according to the needs. Polymers, therefore, are release controlling materials that will determine some of the system specifications.

To design, synthesize and develop these controlled release systems is necessary to take into account a number of pharmaceutical considerations like: type of polymers, the synthesis method, particle sizes, amount of incorporated drug, amount of drug released (*in vitro* and *in vivo*), drug and system stability, surface properties, antigenicity, toxicity, the drug and delivery system biokinetics.

One of the features provided by these systems is the capacity of vectorization for drug targeting with a biologic molecule. A higher therapeutic efficiency is obtained with fewer side effects through specific release at the target site, which has great potential for cancer treatment. One of the molecules used as a vector is the folic acid that has shown greater specificity to some tumor cells that over express folate receptors.

Cancer is a disease with a higher incidence and high mortality. The treatment of this pathology is, many times, limited by the tumors characteristics or the selected drug. One of the treatments of choice is the chemotherapy, by the administration of cytostatic drugs. In many cases, this treatment has low therapeutic efficacy with low specificity leading to numerous side effects.

Tamoxifen (TMX) is a non steroidal antiestrogen and it is the drug of choice for the treatment of breast cancer hormone dependent for years. It has some beneficial effects like its effects in bone density, cardiovascular system and lipid profile but it may produce a hyperproliferation of the endometrium increasing the risk of endometrial cancer and thromboembolic disease. Resistances to this drug have been developed because TMX and its metabolites, including 4 hydroxy-tamoxifen (4OH-TMX), are recognized as substrates by the efflux of P-glycoprotein (P-gp), breast cancer resistance protein (BCRP) and multidrug resistance-associated protein (MRP). When it is orally administered it presents low specificity for tumor cells and, due to its high hydrophobicity and the first-pass metabolism, it has low oral bioavailability.

In this regard the micro and nanoparticulated polymeric systems have shown numerous advantages increasing the amount of drug that reaches the therapeutic target, protecting it from degradation and reducing side effects of the therapy.

### **Objective:**

Taking into account the foregoing considerations, the **main objective** of this work is: "The design, synthesis and characterization of micro- nanoparticulated polymer systems to improve the treatment of breast cancer with tamoxifen"

In order to be able to reach this main goal, secondary objectives have been drawn:

- Designing, synthesizing and characterizing micro / nano systems based on mixtures of poly(lactide-co-glycolide) copolymers that allow the incorporation and controlled release of tamoxifen)
- Designing, synthesizing and characterizing smart systems, sensitive to pH and temperature changes, capable of tamoxifen incorporation and its controlled release with greater specificity to the tumor environment.
- Folic acid attachment to nanosystems in order to target tumor cells that overexpressing the folate receptor.

### **Results:**

Preparation of particles was carried out by the spray-drying process to obtain unloaded and tamoxifen-loaded microspheres of mixtures of (D,L Lactide) and poly(D,L

Lactide-co-glycolide) polymers. The characterization was carried out by FEG-SEM, TGA and *in vitro* drug release studies. Spherical particles with smooth and slightly porous surface were obtained due to rapid evaporation of the solvent during the process. Average diameters were between  $0.8 \pm 0.3$  and  $1.9 \pm 0.7 \mu\text{m}$  with a large percentage of nanoparticles in some cases (11.25 to 77.73%). In all cases, these systems had high thermal stability above  $290^{\circ}\text{C}$ . TGA results showed that systems were able to protect the drug inside from degradation and the stability of the system increases due to hydrophobic interactions between the drug and the polymer. The drug entrapment efficiency was very high; between 70 - 97.8% which corresponds to 36.6 - 48.9  $\mu\text{g}$  TMX / mg MS. These drug incorporations were possible due to prior dissolution of the drug and polymer in the same solvent, favoring the interactions. The release was controlled between 14 - 58 days, depending on the polymer composition, having higher release rate the most hydrophilic systems and reaching a maximum release above 90% of the encapsulated drug in all cases. Microparticles were cytocompatible with the MCF7 cell line and microparticles with Tamoxifen (TMX) were able to decrease progressively cell viability as the drug was released, reaching total death on the sixth day with the more hydrophilic system (PLGA 50/50). *In vivo*, these systems showed good biocompatibility in female Wistar rats because no reaction was developed in the implant site. Different plasma concentrations of TMX and 4OH-TMX (4-hydroxy tamoxifen, a tamoxifen metabolite) were detected depending on the system from which TMX was released. They were capable of achieving controlled plasma concentrations for long periods of time ranging between 17 to 36 ng/ml for TMX and 6.7 to 8.5 ng/ml for 4OH-TMX.

Nanoparticulated systems based on aliphatic polyesters (PLGA) were also synthesized through the technique of emulsion / evaporation by varying the polymer composition. Through the development of this technique, smaller systems were obtained ( $72 \pm 14$  -  $147 \pm 21$  nm) with a smooth surface. These systems have been functionalized with folic acid by previously obtained the PLGA-PEG-FOL (poly lactide-co-glycolide/ poly ethylene glycol / folic acid) polymer. These nanoparticles have been able to incorporate different amounts of drug ( $23 \pm 2$  to  $131 \pm 3 \mu\text{g}$  TMX / mg NP) protecting it from degradation and having thermal stability above  $270^{\circ}\text{C}$ . Functionalized systems had lower stability, being above  $240^{\circ}\text{C}$  in all cases, due to the presence of PEG and Folic acid at the surface. As well as microspheres, controlled release were achieved over a shorter time period reaching concentrations ranging from  $23 \pm 1$  to  $132 \pm 1 \mu\text{g}$  TMX / mg NP between 0.3 and 3.3 days. Folic acid coating modified the surface of the particle; thereby it became more hydrophilic and drug release increased). All the systems

without drug showed good cytocompatibility; however when they were TMX-loaded, cell death was progressively observed in the three cell lines (MCF7, HeLa and T47D) due to drug released. Functionalized systems with folic acid were more effective due to their greater cellular uptake.

Polymeric nanohydrogels (NG) based on N-Isopropylacrylamide (NIPA), N (pyridine 4-methyl) acrylamide (NPAM) and tert-butyl 2-acrylamidoethyl carbamate (2AAECM), as well as folate-conjugate copolymeric nanogels were synthesized and evaluated for antitumor therapy by tamoxifen loading. NPAM and 2AAECM monomers were synthesized and characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and nuclear magnetic resonance. These nanohydrogels, synthesized by microemulsion polymerization, were also characterized. Average diameters were between  $37 \pm 9$  and  $265 \pm 72$  nm. Folic acid was covalently attached to nanohydrogels ( $145 - 209 \mu\text{g Folic/mg NG}$ ) via the reaction of carboxyl groups of folic acid and the amino pendant groups of the nanohydrogels. Tamoxifen was loaded into nanohydrogels post-syntheses ( $39 \pm 7 - 50 \pm 0.4 \mu\text{g TMX/mg NG}$ ). Maximum in vitro TMX release ( $65 - 100\%$  of loaded TMX) took place between 32 and 126 hours. The cytocompatibility of unloaded nanohydrogels in MCF7, HeLa and T47D cells was high and it was slightly lower in the case of functionalized nanogels due to the increased cellular internalization. The administration of TMX by TMX-loaded nanogels was effective on MCF7 and T47D cellular types, and the best results were obtained with folic acid-targeted nanohydrogels.

### **Conclusions:**

The process of spray drying, used as a technique for tamoxifen encapsulation in polymeric systems based on aliphatic polyesters, allows obtaining microparticles with an average size of  $1.5 \mu\text{m}$ , and a significant percentage in the nanometer range. This technique also produces high drug incorporation efficiencies (obtaining drug load in the range  $36$  to  $49 \mu\text{g TMX / mg MS}$ ). These systems are capable of modulating the release of tamoxifen between 11 and 58 days, depending on their polymer composition, and they are therapeutically effective in the MCF7 cell line human breast cancer. In vivo studies have demonstrated the biocompatibility of these polymeric systems which protect the drug from degradation, allowing the presence of tamoxifen in plasma for extended periods of time, reaching twelve times its mean residence time.

Synthesis of nanoparticles based on mixtures of aliphatic polyesters by the technique of emulsion / evaporation resulted in systems with an average size between 72 and 147 nm while maintaining high tamoxifen incorporation efficiencies (obtaining drug loads between 95 and 110  $\mu\text{g}$  TMX / mg NP). They controlled drug release for significant periods of time (3.3 days), although lower than in the systems described above, as befits their smaller size. Its effectiveness has been demonstrated in cell lines of human breast cancer (MCF7 and T47D) and cervix (HeLa) due to decreasing cell viability caused by the tamoxifen release.

Functionalized nanoparticles with folic acid through polyethylene glycol (PEG) generated systems with specific characteristics due to hydrophilic surface modification of these hydrophobic systems, affecting the release of tamoxifen and their interaction with the cell surface. The presence of folic acid on the surface of the nanoparticles increased, in most cases, cellular internalization, but it was also influenced by the composition of the nanoparticle and the cell line. Internalization specifically mediated by folate receptor occurs in all three cell lines with nanoparticles composed of LG50:LG75 (50%). Functionalized nanoparticles loaded with tamoxifen were more effective than the non-encapsulated drug, causing decrease in cell viability in all studied cells.

N-(pyridine 4-methyl) acrylamide (NPAM) ionic monomer and tert-butyl 2-acrylamidoethyl carbamate (2AAECM) monomer have been synthesized to form part of copolymeric and cationic nanohydrogels, prepared from a radical microemulsion polymerization. These systems were sensitive to pH and temperature changes of the environment by the presence of NPAM and N-isopropylacrylamide (NIPA), respectively. Nanogel vectorization was carried out by binding folic acid to the 2AAECM monomer. The synthesized hydrogels had nanometer size (between 37 and 268 nm), incorporated tamoxifen (between 39 and 50  $\mu\text{g}$  TMX / mg NG) and released it in a controlled manner (between 1.3 and 5.2 days) in vitro in the presence of surfactant.

The nanogels were cytocompatible in the cell lines studied, although the presence of folic acid on their surface caused a decrease in cell viability at the first day of the study. This can be attributed to the increased cellular internalization due to the presence of folate. However, specific uptake mediated by folate receptor is only clearly attributable to MCF7 cell line for most of nanosystems, and to T47D cell line for a specific nanogel composition (composition 80.10.10.5x). The nanogels loaded with tamoxifen were effective in cell lines with estrogen receptors (MCF7 and T47D), where the drug exerted its action very specifically.



# **INTRODUCCIÓN**





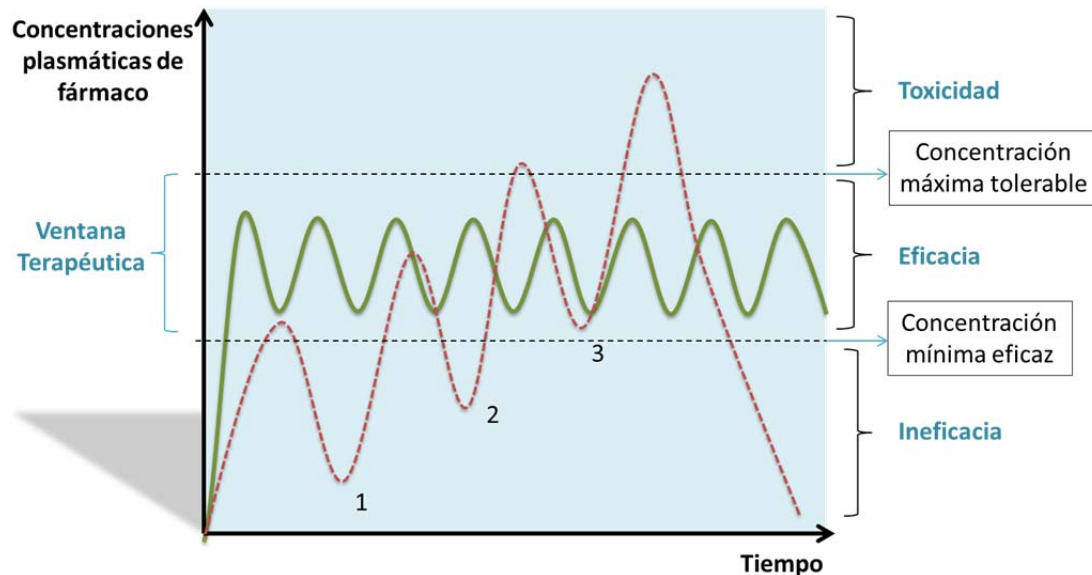
## **1.- SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA**

A lo largo de los años se han ido descubriendo y sintetizando una serie de moléculas con actividad farmacológica sobre determinadas enfermedades y síntomas conocidos como principios activos. Se ha observado que la eficacia del principio activo en un producto farmacéutico depende, en gran medida, de su forma de dosificación (forma galénica). La farmacología y farmacocinética de un compuesto no es, en sí misma, suficiente para asegurar una buena terapia. Un efecto terapéutico óptimo va a depender también del desarrollo de sistemas de dosificación adecuados, de la selección de un sistema de liberación específico para el fármaco y patología, de la formulación (Mainardes & Silva, 2004) (Allen & Cullis, 2004) y de su viabilidad en el lugar de acción (biodisponibilidad) (Allen & Cullis, 2004) (Roney et al., 2005).

En muchas patologías con la administración convencional de medicamentos (cápsulas, comprimidos, inyecciones...) se obtienen buenos resultados terapéuticos, pero en otras ocasiones, estas formas farmacéuticas presentan importantes limitaciones (solubilidad limitada, baja absorción y biodisponibilidad del principio activo) que requieren habitualmente de la administración de dosis mayores (Vilos & Velasquez, 2012) aumentando la probabilidad de producir efectos adversos. Los sistemas de liberación controlada pueden mejorar estas limitaciones, presentando además, un gran número de ventajas que lo hacen imprescindibles para los tratamientos de algunas patologías como puede ser el cáncer y la diabetes entre otros. Una sustancia farmacológicamente activa puede ser encapsulada, adjuntada, incorporada o mezclada con una sustancia transportadora (carrier o vehículo) que va a controlar su liberación (Calixto, Bernegossi, Fonseca-Santos, & Chorilli, 2014), formando los llamados "sistemas de liberación modificada". En estos sistemas, el fármaco es liberado sistemáticamente de forma continua, fija y en concentraciones terapéuticas, pudiendo establecerse un patrón de liberación durante determinados periodos de tiempo. Esto permite que los efectos no deseados y tóxicos producidos por la administración convencional de algunos fármacos se vean reducidos (Mi, Kuan, Shyu, Lee, & Chang, 2000) y se mejore la eficacia terapéutica. La idea global del diseño de estos sistemas es conseguir liberar una cantidad adecuada de fármaco durante un tiempo prolongado en un lugar determinado (Feng & Chien, 2003), teniendo un mayor éxito terapéutico.

La dosis es otro factor determinante en el éxito de la terapia. Es necesario exponer a la diana terapéutica a una concentración suficientemente elevada de fármaco durante un periodo de tiempo necesario para conseguir el efecto farmacológico. En este sentido, la dosis

así como el intervalo de dosificación van a establecer la concentración del fármaco a administrar (pauta posológica), teniendo siempre en cuenta que ha de ser óptima dentro de la ventana terapéutica. Esto implica que ha de estar entre la concentración mínima eficaz (CME) y la concentración máxima tolerable (CMT) (Figura 1). Las formas convencionales de administrar el fármaco proporcionan un control muy pobre de las concentraciones plasmáticas pudiendo alcanzar concentraciones potencialmente tóxicas o ineficaces. En la mayoría de los casos, en una administración convencional, se produce un aumento pronunciado inicial de la concentración plasmática llegando a niveles potencialmente tóxicos, para ir disminuyendo exponencialmente después (por los procesos de eliminación), hasta la siguiente administración (Figura 1) (Freiberg & Zhu, 2004). Si la concentración disminuye demasiado, puede alcanzar concentraciones infraterapéuticas en las que el tratamiento es inefectivo. Para solucionar esta ineficacia es necesario administrar dosis mayores o más consecutivas. Sin embargo si alcanza concentraciones supraterapéuticas, da lugar a toxicidad. Así nos podemos encontrar con periodos alternativos de ineficacia o toxicidad si no se consigue un buen control de las concentraciones.



**Figura 1:** Curva de la concentración plasmática de un fármaco al ser administrado, en función del tiempo. Comparación entre una forma farmacéutica convencional (-----) y un sistema de liberación controlada (———). La línea verde continua representa un sistema de dosificación controlada y la curva discontinua roja representa un tratamiento convencional a base de tres administraciones sucesivas.

Estas necesidades en la mejora la terapia convencional han exigido el desarrollo de las nuevas técnicas de administración de compuestos bioactivos, encaminadas a conseguir que, con una única dosis, la concentración del fármaco en el organismo se mantenga fuera de los límites extremos de ineficacia y toxicidad durante el periodo de tiempo del tratamiento. El caso ideal sería conseguir concentraciones constantes y eficaces de esta sustancia activa con la administración de una única dosis más pequeña y lograr la ausencia de efectos secundarios (Langer & Peppas, 1981) (Yasukawa et al., 2004). Con los sistemas de liberación controlada estos periodos de toxicidad o ineficacia serían inexistentes puesto que como su propio nombre indica controlan siempre la concentración plasmática dentro de la ventana terapéutica.

Otro aspecto importante para el éxito de una terapia es el cumplimiento posológico por parte del paciente. En este sentido el paciente debe de ser responsable y constante a la hora de tomarse la dosis correspondiente en la posología marcada para mantener concentraciones plasmáticas eficaces. En muchas ocasiones, por factores como el olvido o despiste, hay dosis que no se administran y por lo tanto la eficacia del tratamiento se ve disminuida o interrumpida. Con la terapia controlada se consigue aplicar varias dosis en una única administración (forma farmacéutica), mejorando en el cumplimiento posológico ya que disminuye el número de dosis a administrar al día y se disminuye el factor “olvido” haciendo que la terapia sea constante en todo momento. El hecho de que el paciente esté siendo tratado durante largos periodos de tiempo, sin estar pendiente en cada momento de la posología, mejora además su calidad de vida.

Hay un gran número de sistemas que se han desarrollado a lo largo de los años, capaces de modular la liberación del principio activo que contienen, entre ellos nos podemos encontrar los parches transdérmicos, comprimidos recubiertos, sistemas OROS (oral reléase osmotic systems) y sistemas multiparticulados (liposomas, pellets,...) entre otros. En los sistemas multiparticulados se encuentran las nanopartículas, las cuales están teniendo un interés cada vez mayor debido a su versatilidad en aplicaciones farmacéuticas y sus propiedades, que proporcionan numerosas ventajas. Estos sistemas de liberación controlada nanométricos se encuentran, por tanto, dentro de la llamada nanomedicina. Un gran campo dentro de la nanomedicina es el desarrollo de agentes farmacéuticos, terapéuticos y diagnósticos de tamaño nanométrico (*Figura 2*) para su administración por ruta intersticial o intravenosa (Moghimi, Hunter, & Murray, 2005) y otras vías de administración como pueden ser la vía oral y cutánea. Para conseguir diseñar y sintetizar estos sistemas es necesaria la nanotecnología, definida como la ciencia e ingeniería que encierra el diseño, síntesis,

caracterización y aplicación de los materiales y sistemas con un tamaño, al menos una dimensión, dentro de las dimensiones en la escala nanométrica (normalmente comprendida entre 1-100 nm) Controlando la forma y el tamaño (Yang, Peters, & Williams, 2008). A través de la nanotecnología son muchos los sistemas que se pueden obtener dependiendo del material utilizado y del método de síntesis, alguna de ellas se describe a continuación (*Figura 2*):

**LIPOSOMAS:** Son sistemas vesiculares, esféricas y lipídicas, compuestas por fosfolípidos anfifílicos formando una estructura bicapa hidrofóbica dejando un núcleo central hidrofílico (Parhi, Mohanty, & Sahoo, 2012). Forman estructuras similares a las membranas lipídicas del organismo. Presentan un tamaño entre 80 – 300 nm (Sunderland, Steiert, Talmadge, Derfus, & Barry, 2006) y son fáciles de sintetizar ya que se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos son dispersados en un medio acuoso (Silva, Ferreira, & Cavaco-Paulo, 2011) y alcanzan la concentración mínima micelar (CMM).

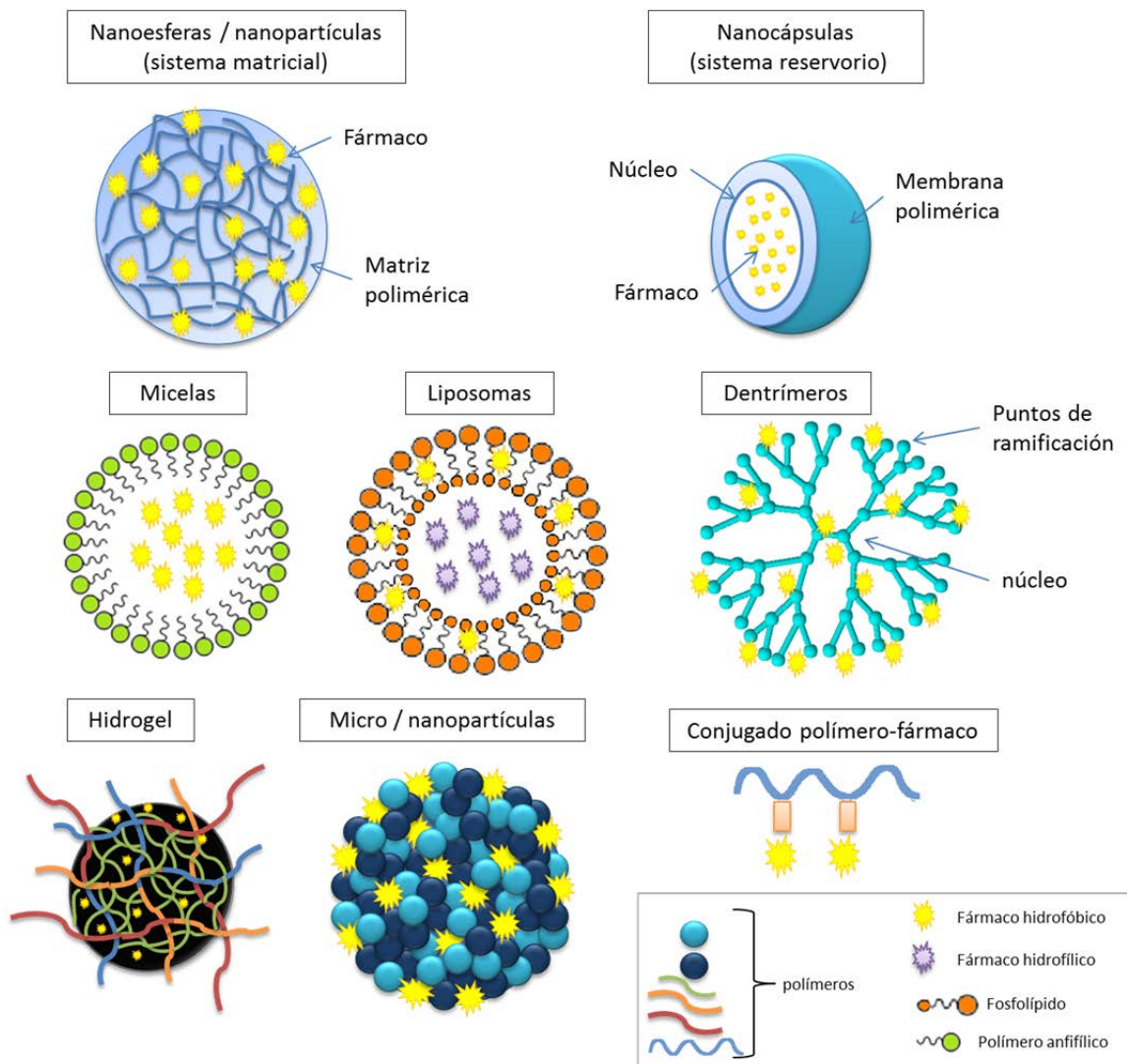
**NANOPARTICULAS POLIMÉRICAS:** Partículas coloidales submicrométricas de tipo reservorio o matricial donde el fármaco es disuelto, atrapado, encapsulado o unido a la matriz polimérica (Calixto et al., 2014) (Sahoo & Labhasetwar, 2003). Estas partículas presentaran unas características u otras en función del polímero que lo forme.

**DENDRÍMEROS:** compuestos macromoleculares sintéticos que constan de unas tres ramificaciones alrededor de un núcleo (Nanjwade, Bechra, Derkar, Manvi, & Nanjwade, 2009) (Dykes, 2001). El núcleo tiene características hidrofóbicas siendo la periferia hidrofílica (Onoue, Yamada, & Chan, 2014). La ventaja que presentan es están bien definidos estructuralmente y en la superficie tienen numerosos grupos funcionales que son fácilmente reconocidos por procesos biológicos (Svenson & Tomalia, 2005).

**MICELAS:** son nanoestructuras formadas por un auto ensamblaje supramolecular de copolímeros anfifílicos en bloque (con unidades hidrofílicas e hidrofóbicas) en un medio acuoso por uniones iónicas (par iónico) o interacciones hidrofóbicas (Onoue et al., 2014).

**CONJUGADOS POLIMERO-FÁRMACO:** son cadenas poliméricas simples a las cuales está unida el principio activo de forma covalente a través de la reacción con grupos funcionales.

**HIDROGELES:** entramados poliméricos hidrofílicos y tridimensionales que presentan una morfología semisólida y son capaces de absorber una elevada cantidad de agua (Ashwanikumar, Kumar, Nair, & Kumar, 2012).



**Figura 2:** Esquema de sistemas poliméricos nanoparticulados en la nanomedicina.

### 1.1.- Micro/nanopartículas poliméricas

Estos sistemas particulados son muy utilizados debido a sus características y a la extensa versatilidad que presentan. Protegen al principio activo de su degradación enzimática o hidrolítica y controlan su liberación teniendo un tamaño comprendido entre 10 – 1000 nm (Mora-Huertas, Fessi, & Elaissari, 2010). Pueden estar formadas por diversos tipos de

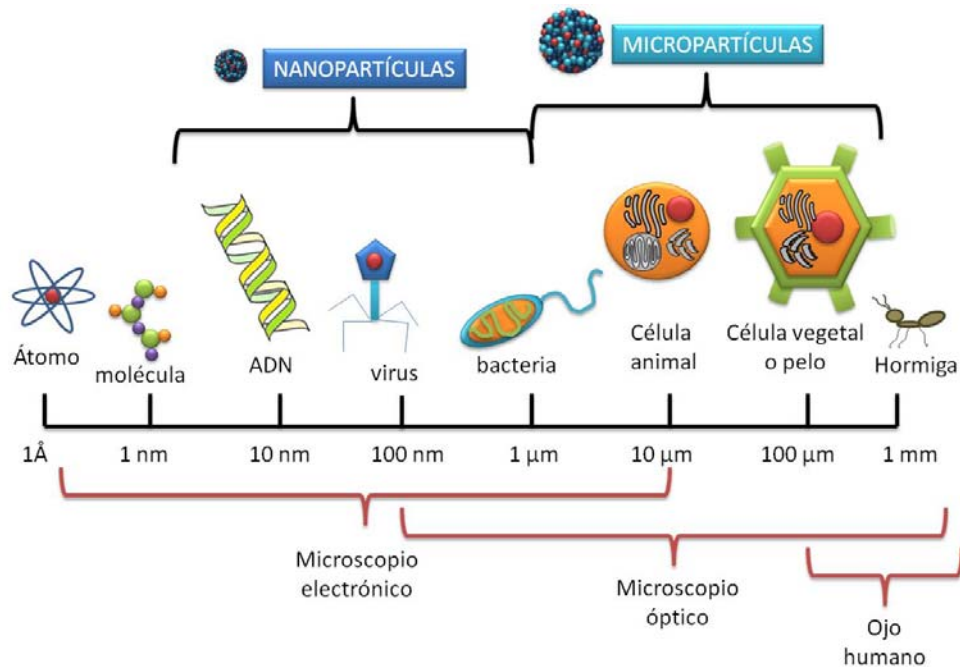
polímeros, desde sintéticos (Poliacrilamida, policaprolactona, poli láctico-co-glicólico) hasta polímeros naturales (albumina, quitosano, alginato, gelatina) (Wilczewska, Niemirowicz, Markiewicz, & Car, 2012), lo que facilita la modulación de las características, el comportamiento final y el diseño personalizado de los sistemas en función de las necesidades. Los polímeros, por lo tanto, son materiales controladores de liberación que van a determinar las especificaciones del sistema.

El concepto de liberación controlada de sustancias bioactivas mediante polímeros remonta a los años 60s (Chang, 1964) con la silicona (Folkman & Long, 1964) y polietileno (Desai, Simonell, & Higuchi, 1965) pero la falta de degradación de estos materiales limitó su aplicación puesto que requerían su retirada y eliminación después de liberar el principio activo. La degradación fue incorporada años después por Mason y colaboradores (Mason, Thies, & Cicero, 1976), por lo que hasta en los años 1970s no surgieron los polímeros biodegradables (Jalil & Nixon, 1990). De esta forma muchas sustancias activas han sido encapsuladas en vehículos particulados biocompatibles con un amplio intervalo de aplicaciones farmacológicas en la liberación controlada, biológicas e ingeniería de tejidos (Shim, Kim, & Yang, 2013).

Estos sistemas micro/nanoparticulados se basan en materiales poliméricos con suficiente biocompatibilidad y unas propiedades físicas y químicas apropiadas para conseguir un control de la liberación y su aplicación en el organismo. La biocompatibilidad y biodistribución son parte de la clave del éxito del desarrollo del fármaco por lo que el estudio tanto *in vitro* como *in vivo* son necesarias para alcanzar el objetivo deseado (Kura, Fakurazi, Hussein, & Arulselvan, 2014).

Las características, propiedades y comportamiento del sistema va a depender, por tanto, de diversos factores como: tamaño de la partícula, tipo de sistema (matricial o reservorio), tipos de polímeros utilizados y método de síntesis, entre otros. Dependiendo del método de preparación se pueden desarrollar diferentes sistemas desde tipo matricial (ej. nanoesferas) o tipo reservorio (ej. nanocápsulas) (Couvreur, 2013) (*Figura 2*). En un sistema de tipo matricial la sustancia activa se encuentra dispersa por todo el material polimérico de forma homogénea mientras que en un sistema de tipo reservorio, la sustancia activa se queda en el confinada en el núcleo de la partícula rodeado de una capa polimérica que lo recubre (Brigger, Dubernet, & Couvreur, 2012). En función del tamaño obtenido se denominan micropartículas cuando presentan un tamaño superior a 1  $\mu\text{m}$  mientras que las nanopartículas

son estructuras con un rango de tamaño comprendido desde algunos nanómetros hasta cientos de nm (Peer et al., 2007) (Figura 3). Estas últimas presentan un mayor número de aplicaciones biomédicas y de ventajas, sobre todo como sistemas de liberación controlada debido a su tamaño nanométrico.



**Figura 3:** Escala de tamaños, desde el tamaño de una hormiga (1 mm) hasta el tamaño atómico (1 Å).

Los nanotransportadores presentan múltiples características y ventajas como:

- Protegen al fármaco que contienen de la degradación (Du, Mao, Yuan, Yang, & Wang, 2014)
- Aumentan la viabilidad del fármaco en el lugar de acción
- Aumentan el tiempo de permanencia del fármaco en plasma (Du et al., 2014)
- Disminuyen los efectos adversos de la terapia
- Mejora la eficacia terapéutica
- Presentan vectorización pasiva por sus características morfológicas (Patra & Turner, 2014)
- Tienen la posibilidad de realizar una vectorización activa
- Modifican la biodistribución (Brigger et al., 2012)
- Controlar la liberación
- Inhibir los mecanismos de resistencia de las células (MDR) (Patra & Turner, 2014)
- Producen una menor inflamación y respuesta inmunitaria en los tejidos comparado con partículas de mayor tamaño



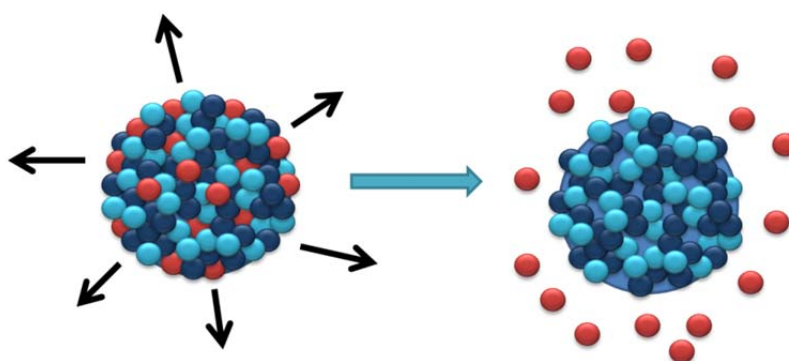
- Elevada permeabilidad a través de membranas
- Múltiples vías de administración debido a su pequeño tamaño (Onoue et al., 2014)
- Mejoran la solubilidad de fármacos favoreciendo su administración (Lu, Li, Zink, & Tamanoi, 2012) (Sun et al., 2014)
- Favorecen la vehiculización hasta los tumores por el efecto de permeabilidad y retención (EPR) (Maeda & Matsumura, 2011)

Hasta principios de los años setenta era imposible considerar una administración intravenosa de una suspensión debido a la posibilidad de producir un embolismo, hoy en día es posible gracias a las NPs (de tamaño muy pequeño) ya que en suspensión aumenta la eficacia y la especificidad (Couvreur, 2013). Una de las vías de administración más ventajosa, en principio, para sistemas micro/nanopoliméricos de liberación controlada es la parenteral, es decir, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular. La gran ventaja de estos sistemas micro/nanoparticulados frente a soluciones alternativas, como los implantes, es que, debido a su pequeño tamaño, pueden ser inyectados con una jeringa convencional, no necesitando por tanto intervención quirúrgica.

Estos sistemas incorporan el fármaco en su interior mediante diversos mecanismos como uniones covalentes, absorción o interacciones hidrofóbicas / hidrofílicas. Al contener el fármaco son capaces de protegerlo en su interior de una degradación previa a su llegada al lugar de acción como es el efecto hepático de primer paso o procesos hidrolíticos. Al disminuir su degradación, mayor cantidad de fármaco es capaz de llegar a la diana terapéutica (Nevozhay, Kanska, Budzynska, & Boratynski, 2007) incrementando la eficacia. Otra ventaja es la vectorización, dirigiendo al fármaco a su lugar de acción (biofase) de forma específica disminuyendo su distribución por otras zonas del cuerpo donde produce efectos adversos. Con estos sistemas, por tanto, se puede controlar la biodistribución del fármaco por el organismo. Son reconocidas como cuerpos externos y, por tanto, son susceptibles de ser captados por el sistema mononuclear fagocitario. Al ser fácilmente opsonizados y fagocitados por los macrófagos aumentan su acumulación en el hígado, pulmón y hueso marrón, lo cual es beneficioso cuando la patología a tratar se localice en alguna de estas zonas. Por el contrario si la diana terapéutica se encuentra en otra colocación se puede conseguir cambiar esta biodistribución modificando la superficie de los sistemas y que presenten características más hidrofílicas. Este efecto hace a las partículas “invisibles” al sistema fagocítico mononuclear aumentando su permanencia en la circulación pudiéndose almacenar en otros órganos o

células. Para conseguir una superficie hidrofílica se utilizan polímero hidrofílicos como poli etilenglicol (PEG), poloxaminas, poloxameros y polisacáridos (des Rieux, Fievez, Garinot, Schneider, & Preat, 2006) (Starm, Belliot, Daemen, & Lasic, 1995) (Torchilin & Trubetskoy, 1995). Otra posibilidad para modificar la biodistribución es con una vectorización activa, añadiendo a la superficie moléculas señalizadoras (biológicamente activa) que dirijan el sistema a un lugar en concreto del organismo que presente receptores de las moléculas funcionalizadoras. A través del funcionalización y vectorización se puede enviar al principio activo específicamente a un tipo de tejido, órgano, o incluso a un lugar intracelular.

Como ya se ha comentado anteriormente, estos sistemas son capaces de controlar la liberación. El fármaco en el interior de estos sistemas se puede liberar por distintos mecanismos en función de: como se encuentre unido al polímero (de forma covalente, por interacciones iónicas, por interacciones hidrofóbicas...), de donde se localice dentro del sistema (sistema matricial o reservorio), de sus características físico-químicas, y de las características de los polímeros que forman el sistema. Todo esto definirá los mecanismos por los cuales se libera el fármaco (difusión, erosión o hinchamiento). La velocidad de liberación desde el sistema polimérico (*Figura 4*) que rodea al fármaco va a venir determinada, principalmente por las propiedades del propio polímero, y en menor medida, por los factores ambientales como el pH, temperatura y el tipo de fluidos del organismo (Bae, Okano, & Kim, 1991).



**Figura 4:** Representación de una nano/microesfera que libera el fármaco que contiene en su interior.

● fármaco, ● polímero hidrofóbico, ● polímero hidrofílico

Se ha observado que mucho de los tratamientos convencionales a determinadas patologías pierden eficacia debido al desarrollo de resistencias. En el caso del cáncer, las

células, han desarrollado un sistema de resistencia múltiple a fármacos con el que se disminuye la eficacia de los tratamientos con quimioterapia. Los sistemas poliméricos han demostrado que son capaces inhibir estas resistencias, mejorando la terapia, siendo otra de las numerosas ventajas pueden aportar.

Para conseguir diseñar, sintetizar y desarrollar estos sistemas de liberación controlada se han de tener presentes una serie de consideraciones farmacéuticas: tipo de material controlador, método de preparación, tamaño de las partículas, cantidad de fármaco a incorporar, carga inicial, fármaco liberado (*in vitro e in vivo*), estabilidad del fármaco, estabilidad del sistema de liberación, almacenamiento, propiedades de la superficie, presentación, antigenicidad, biofase y toxicidad del sistema de liberación, fármaco y biocinética del sistema de liberación.

## **1.2.- Hidrogeles:**

Son sistemas multiparticulados, con una estructura tridimensional con capacidad de captar elevadas cantidades de agua (Schoener, Hutson, & Peppas, 2013), lo que les proporciona la habilidad de hincharse (Phillips, Gran, & Peppas, 2010) (Bouwstra & Junginger, 1993). Están formados por polímeros fundamentalmente hidrofílicos entrecruzados que presentan aperturas y poros en el entramado de su estructura, lo que permite la encapsulación de sustancias en su interior con su posterior liberación (Pikabea, Ramos, & Forcada, 2014). Por este motivo han sido muy utilizados como sistemas de liberación controlada de fármacos antitumorales (Calixto et al., 2014).

La capacidad de hinchamiento se la deben a la presencia de grupos ionizables (Ashwanikumar et al., 2012), mayormente atribuida por la presencia de grupos hidroxilo como  $-OH$ ; o  $-COOH$ ;  $-CONH-$ ;  $-SO_3H-$  (Pillai et al., 2014). El grado de hinchamiento va a venir determinado por varios factores como la densidad de entrecruzante, la composición polimérica hidrofílica (Peppas & Leobandung, 2004), medio acuoso en el que se encuentre el sistema (Patel, Patel, Shah, & Modasiya, 2011) y otros factores como la temperatura, fuerza iónica y pH del medio. A pesar de la hidrofilia que presenta el sistema, se consideran insolubles por el entramado polimérico entrecruzado (Blanco, Olmo, & Teijon, 2007). Una de las grandes ventajas que presentan los hidrogeles es que sus características se pueden modular dependiendo de la finalidad y aplicación buscada. De esta forma, a mayor hidrofilia de los

polímeros que lo forman y menor porcentaje de entrecruzamiento, mayor grado de hinchamiento se alcanza en el sistema. El entrecruzamiento de la matriz puede conseguirse por fuerzas cohesivas débiles (como fuerzas de van der Waals o puentes de hidrógeno) (Peppas & Leobandung, 2004) o uniones más fuertes como enlaces covalentes o iónicos. Este entrecruzamiento es de gran relevancia en el sistema, ya que ayuda a ralentizar y controlar la liberación del fármaco, la posible degradación del sistema y mejora las propiedades físicas del hidrogel (incluyendo las propiedades mecánicas) (Gupta, Vermani, & Garg, 2002) (Hennink & van Nostrum, 2002). Cabe destacar que el elevado contenido en agua que es capaz de embeber hace que se asemejen a los tejidos biológicos, reduciendo la tensión interfacial con los fluidos biológicos y promocionando la biocompatibilidad (Hamidi, Azadi, & Rafiei, 2008).

A parte de la capacidad de hinchamiento, estos sistemas presentan una serie de propiedades físicas como permeabilidad, resistencia mecánica, algunos aspectos superficiales que pueden producir la modificación de su estructura (Giri et al., 2012), lo que hace factible su posterior vectorización. Además presentan una consistencia blanda y elástica (Slaughter, Khurshid, Fisher, Khademhosseini, & Peppas, 2009), lo que les proporciona gran semejanza con el medio biológico aumentando sus aplicaciones biomédicas.

Otra de las características que ha despertado gran interés y ha incrementado su utilidad, es la posibilidad de ser sensible a múltiples estímulos que reciban del medio en el que se encuentran, cambiando su comportamiento de hinchamiento, estructura polimérica, permeabilidad o estabilidad (Pikabea et al., 2014) en función de éstos. Esta sensibilidad se puede modular dependiendo de su composición polimérica del sistema, consiguiendo respuesta ante cambios de pH, temperatura, fuerza iónica, campo magnético, corriente eléctrica, ultrasonidos o incluso compuestos biológicos.

Los hidrogeles termosensibles son capaces de variar su hinchamiento en función de los cambios térmicos del medio donde se encuentran. En este sentido se diferencian dos tipos de hidrogeles: positivos o negativos. Se consideran hidrogeles termopositivos a aquellos que son capaces de hincharse cuando aumenta la temperatura y termonegativos a aquellos que colapsan cuando se incrementa la temperatura (Saito, Konno, & Inomata, 1993). En este sentido el PNIPA (poli-N-isopropilacrilamida) ha sido ampliamente usado como polímero termosensible con una temperatura LCST (lower critical solution temperature) de 32-34°C (Yoshida & Okano, 2010), por encima de la cual el polímero colapsa de forma reversible al perder sus uniones hidrofóbicas con el agua mientras que cuando la temperatura desciende

por debajo de los 32°C el polímero se hincha al recuperar e incrementar las uniones hidrofóbicas con el medio acuoso. El LCST del PNIPA, tan próximo a la temperatura corporal, ha hecho que tenga especial interés para la biomedicina. Ya en 1986 fue usado por Dong y Hoffman (L. Dong & Hoffman, 1986) para inmovilizar enzimas en hidrogeles de NIPAAm y AAm (acrilamida) y a día de hoy se sigue investigando para formar parte de sistemas de liberación controlada de fármacos. Entre otros polímeros termosensibles nos encontramos: poli (N,N-dietilacrilamida), poli (metil vinil eter), poli (N-vinilcaprolactam) o pluronics (Sun et al., 2014).

Los hidrogeles también pueden ser pH sensibles cuando los polímeros que lo forman presentan grupos ionizables. Estos grupos pueden ser ácidos o básicos que, a determinados pH y fuerza iónica del medio donde se encuentran, se cargan positiva o negativamente produciendo el hinchamiento del hidrogel, debido a la repulsión de las cargas en las cadenas poliméricas. Cuanto mayor es el número de grupos funcionales cargados en el entramado, mayor es la repulsión y, en consecuencia, mayor es el hinchamiento del sistema. Según la ionización del sistema se puede clasificar los hidrogeles en cuatro tipos diferentes (Peppas & Hoffman, 2013):

1. Hidrogeles neutros: no presentan carga
2. Hidrogeles aniónicos: presentan carga negativa
3. Hidrogeles catiónicos: presentan carga positiva
4. Hidrogeles anfifílicos: su pueden cargar tanto positiva como negativamente

Grupos carboxílicos y sulfúricos formarán hidrogeles aniónicos presentando hinchamiento cuando el pH del medio está por encima del pKa del grupo ionizable, mientras que los hidrogeles catiónicos presentan grupos amino alcanzando el estado hinchado cuando el pH del medio está por debajo del pKb de las especies ionizables (Liechty & Peppas, 2012) (Peppas & Leobandung, 2004). Alguno de los polímeros estudiados hasta ahora sensibles al pH son: el ácido poli acrílico, ácido polimetacrilato y el poli dimetilaminoetil metacrilato. Los hidrogeles sensibles a pH han recibido especial atención en aplicaciones biomédicas siendo capaces de responder a pequeñas variaciones de pH. De esta forma, pueden ser utilizadas en distintos niveles: nivel de órgano (tracto gastrointestinal), nivel tisular (medio extracelular acidificado de tejidos no sanos), nivel celular (endolisosomas más acidificados comparados con el resto del citoplasma celular) (Gao, Chan, & Farokhzad, 2010) (Zha, Banik, & Alexis, 2011). Los hidrogeles catiónicos han demostrado buenas habilidades para liberar fármacos

anticancerígenos en medios acidificados (Loomis, McNeeley, & Bellamkonda, 2011), como es el caso de una región tumoral y además las cargas positivas presentan una mayor afinidad por la membrana celular con posterior internalización (Du, Sun, Song, Wu, & Wang, 2010), lo que mejora el reconocimiento y la terapia antitumoral.

Los hidrogeles, aunque se consideran insolubles, pueden presentar biodegradación hidrolítica o enzimática dependiendo de la naturaleza de los polímeros que forman las cadenas principales, secundarias o del entrecruzante (Qiu & Park, 2001) (Gombotz & Pettit, 1995). Fundamentalmente estos sistemas se diseñan con esta característica para su aplicación en la regeneración tisular (Garcia, Aguilar, & San Román, 2010).

Hay diferentes métodos de síntesis de hidrogeles, a través de procesos de entrecruzamiento físicos (Hittinger, Kokil, & Weder, 2004) o químicos. Los métodos químicos se basan en la unión covalente de oligómeros y monómeros a través de la reacción entre dos grupos funcionales, de dos moléculas diferentes. Entre los grupos funcionales que pueden dar lugar a estas reacciones de entrecruzamiento covalente se encuentran grupos vinílicos, grupos carboxílicos, grupos amino, grupos hidroxilo, sulfhídricos (Grieshaber, Jha, Farran, & Jia, 2011). La polimerización por radicales libres es el método ampliamente utilizado, en el cual, cadenas poliméricas se propagan a través de la consumición de monómeros vinílicos. Para este tipo de reacciones se necesita un buen disolvente, estabilizadores, monómeros, entrecruzante y un iniciador de la reacción. Las polimerizaciones vía radicales libres constan de tres etapas principales: iniciación, propagación y terminación (Heath & Cooper, 2013). En la primera fase, los monómeros se activan térmicamente, fotoquímicamente o iónicamente, lo que le permite empezar a reaccionar con el resto de monómeros y continuar con la propagación. Finalmente cuando todos los monómeros y entrecruzantes han reaccionado entre sí, dos radicales libres reaccionan conjuntamente terminando la síntesis. Es de relevancia el proceso de purificación posterior a la síntesis para eliminar todos aquellos componentes que pueden ser potencialmente tóxicos, como puede ser el iniciador, monómero que no han reaccionado, estabilizadores o disolvente orgánico. Estos procesos de purificación se pueden llevar a cabo con lavados o diálisis. El entrecruzante durante la síntesis se encarga de interconectar diferentes cadenas lineales poliméricas generando la estructura tridimensional. Este componente es de gran relevancia en el sistema puesto que, como ya se ha comentado anteriormente, proporciona propiedades mecánicas al hidrogel y disminuye su solubilidad, pero también el porcentaje de entrecruzamiento determina el grado de hinchamiento, el tamaño de poro, el área de superficie total y la resistencia mecánica del sistema (Blanco et al.,

2007), por lo que, grados de entrecruzamiento mayores hace que el entramado pierda flexibilidad y sea más rígido.

La polimerización se puede llevar a cabo: en masa (formando fundamentalmente hidrogeles de forma y tamaño igual al del molde donde se lleve a cabo la reacción, usada para obtener estructuras cilíndricas o films...), en suspensión (generando hidrogeles en forma de perlas) o en emulsión (generando estructuras esféricas más pequeñas) (Blanco et al., 2007). A través de la polimerización en emulsión se pueden conseguir estructuras micro y nanométricas consiguiendo las ventajas anteriormente comentadas en el transporte de fármacos a través de barreras biológicas. Hidrogeles a nanoescala son de particular interés en la liberación de fármacos debido a sus dimensiones (es decir, lo suficientemente grande para evitar el aclaramiento renal y lo suficientemente pequeño para evadir RES), la capacidad de carga de fármaco, la estabilidad coloidal, y gran área de superficie para la conjugación con ligandos (Liechty & Peppas, 2012).

Al igual que los sistemas anteriores (nanopartículas), los hidrogeles están formados por polímeros que van a modular su comportamiento y características mejorando la terapia y presentando numerosas ventajas. Sin embargo una de las diferencias, con respecto a las nanopartículas, es su capacidad de hinchamiento y colapso ante determinadas condiciones ambientales, lo que les hace inteligentes para reconocer el momento y lugar específico donde liberar el principio activo, incrementando la especificidad de la terapia. De esta forma modulando el grado de hinchamiento, la densidad de entrecruzamiento, velocidad de degradación, cinética de liberación se puede conseguir alcanzar la liberación controlada de un fármaco de forma deseada (Slaughter et al., 2009).

### **1.3.- Vectorización**

En las últimas dos décadas, el interés por nanosistemas ha incrementado significativamente y se ha conseguido desarrollar satisfactoriamente sistemas que disminuyen la toxicidad e incrementan la eficiencia de la terapia, sin embargo su vectorización está todavía bajo desarrollo (Onoue et al., 2014).

La vectorización es la capacidad que presentan los sistemas de liberación controlada para localizar o dirigir el fármaco al lugar de acción. De tal forma que se obtenga una mayor eficiencia terapéutica con menores efectos adversos a través de la especificidad en el lugar de

liberación, lo que presenta un gran potencial para el tratamiento del cáncer (Farokhzad et al., 2006).

Hay diversos tipos de vectorización:

Vectorización pasiva: es aquella en la que la partícula llega específicamente al lugar de acción aprovechando las características propias del organismo sin modificar u alterar ningún proceso. Un ejemplo es el retículo endotelial RES (sistema fagocítico mononuclear), es un sistema de defensa que fagocita todo aquel cuerpo extraño que se encuentre en circulación sistémica para transportarlo al hígado o bazo donde son eliminados. Esto se puede aprovechar cuando la diana son dichos órganos (Stern & McNeil, 2008). Otro ejemplo de vectorización pasiva es el que nos encontramos con el cáncer. Los nanosistemas presentan un tamaño lo suficientemente grande como para no extravasarse por los vasos sanguíneos normales y permanecer en circulación sistémica pero son lo suficientemente pequeños para pasar a través de las fenestraciones de los vasos sanguíneos tumorales (Haley & Frenkel, 2008) donde permanecen retenidos durante largos periodos de tiempo por la falta de drenaje linfático ya que se encuentra dañado.

Vectorización activa: conlleva la modificación de la superficie del sistema de forma específica quedando totalmente cubierta con una molécula que va a ser la responsable de que la liberación se lleve a cabo solo y exclusivamente en el lugar de acción. Esta posibilidad permite la incorporación de moléculas señalizadoras (ligandos) en la superficie a través de la unión a grupos funcionales reactivos libres en los sistemas (Blanco, Olmo, & Teijón, 2012), lo que proporciona una funcionalización y vectorización activa. Este tipo de funcionalización o vectorización supone un gran avance terapéutico, ya que permite una liberación del fármaco en las células dianas e incluso una liberación intracelular basándose en procesos de reconocimiento celular (interacciones ligando - receptor o anticuerpo - antígeno) (Brigger et al., 2012). Hay disponibles y en desarrollo diferentes ligandos altamente cualificados como anticuerpos, péptidos y aptámeros que pueden acelerar el desarrollo de la próxima generación de nanosistemas con un potencial terapéutico elevado (Onoue et al., 2014).

Esta vectorización puede ser de primer orden si lleva el fármaco a un órgano o tejido, de segundo orden llevan el fármaco a un tipo celular y de tercer orden si dirigen el fármaco a un lugar intracelular (Ruenraroengsak, Cook, & Florence, 2010) siendo esta última la vectorización más específica.



Esta vectorización activa se puede conseguir de forma física cuando la liberación se produce por cambios físicos del medio (como pueden ser la temperatura, el pH, la intensidad de luz, fuerza iónica, concentración de glucosa, fuente eléctrica o fuerza magnética) o puede ser una vectorización activa mediada por ligandos. En este último caso una molécula biológica es unida en la superficie de la partícula de tal forma que puede ser reconocida por receptores específicos de determinadas células u órganos aumentando así su captación celular a través de una endocitosis. En esta situación nos encontramos uniones anticuerpo - antígeno y molécula - receptor. Dependiendo del tipo de interacción ligando - receptor, la velocidad de internalización celular puede variar, lo que es un factor importante que puede afectar a la acumulación de las nanopartículas en el tumor (Blanco et al., 2012).

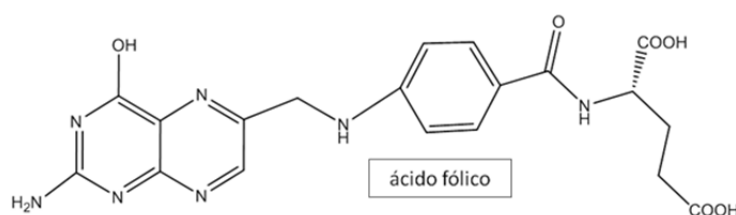
Se ha observado que muchos tumores sobreexpresan determinados receptores en las membranas celulares (Du et al., 2014). La unión de sus correspondientes ligandos a sistemas de liberación controlada incrementa esta vectorización activa. Alguno de los ligandos que han sido usados para la vectorización de sistemas nanoparticulados para el tratamiento contra el cáncer se especifican a continuación:

Aptámeros: son hebras simples de DNA, RNA o oligonucleósidos sintéticos que se pliegan en estructuras únicas capaces de unirse a dianas específicas con elevada afinidad y especificidad (Babu, Templeton, Munshi, & Ramesh, 2014). No son inmunogénicos y son elevadamente estables y su tamaño puede variar entre 20 y 80 nucleótidos (Levy-Nissenbaum, Radovic-Moreno, Wang, Langer, & Farokhzad, 2008) (Orava, Cicmil, & Gariepy, 2010). Receptor humano epidermal (HER): forma parte de la familia tirosina quinasa, la cual presenta un papel fundamental en la proliferación, diferenciación y el desarrollo celular. Se encuentran sobre expresados en algunos tumores. Presenta 4 miembros (EGFR, HER2, HER3 y HER4). Para el receptor EGFR se conocen 6 ligandos endógenos (EGF, factor de crecimiento transformante  $\alpha$ , anfieregulina, betacelulina, heparina y epiregulina) (Laskin & Sandier, 2004) mientras que el receptor HER2 es una de las dianas de la inmunoterapia (Nahta & Esteva, 2006). Otro receptor que se encuentra sobre expresado en tumores es el receptor de la transferrina (Kumar & Lutful, 2014) (Yoon et al., 2009). La transferrina es una glicoproteína encargada de transporta hierro a las células en proliferación, ya que es un cofactor necesario para la síntesis de DNA. De esta forma la transferrina ha sido usada como ligando (Qian, Li, Sun, & Ho, 2002) para conseguir una liberación intracelular de numerosos fármacos antitumorales, así como toxinas, DNA, oligonucleótidos, SiRNAs y enzimas. El receptor de la hormona liberadora luteinizante es otra posible vectorización activa ya que se encuentra sobre expresada en cáncer de ovario,

mama y próstata (Kim, Jeong, Lee, Kim, & Park, 2008). Otras moléculas que han sido desarrolladas en esta dirección con los anticuerpos monoclonales específicos para un antígeno tumoral (Sutradhar & Amin, 2013).

El ácido fólico es conocido como ligando hidrofílico y muy utilizado para conseguir una vectorización activa (Kilicay et al., 2011) (Mansouri et al., 2006) (Liang et al., 2011) (Zhao & Yung, 2008), ya que, permite dirigir las nanopartículas a la membrana celular que expresen los receptores de folato, aumentando su incorporación a través de endocitosis. En su estructura química, el ácido fólico, tiene un  $\gamma$ -carboxílico a través del cual puede reaccionar y unirse a otras moléculas, como polímeros, de forma covalente. Esto facilita la manipulación y su unión a los sistemas poliméricos (*Figura 5*). El ácido fólico además presenta numerosas ventajas en comparación con otros ligandos (Perez-Alvarez, Saez-Martinez, Hernaez, Herrero, & Katime, 2009):

- Pequeño tamaño
- Su conjugación simple (Yu, Tai, Xue, Lee, & Lee, 2010)
- No inmunogenicidad (Reddy & Low, 1998)
- Buena biodisponibilidad
- Bajo coste (Low & Antony, 2004) (Talekar, Kendall, Denny, & Garg, 2011)
- Elevada afinidad por el receptor (Chen, Li, Shen, He, & Zhang, 2011)
- Ayuda a sortear la resistencia tumoral (MDR) (Bazak, Hour, El AS, Kamel, & Refaat, 2015)



**Figura 5:** molécula química del ácido fólico

La especificidad de la vectorización con esta molécula además se ve aumentada ya que los receptores de ácido fólico se encuentran sobre expresado solo en un determinado tipo de células como son células epiteliales cancerosas incluidos ovario, riñón, útero y es raro

encontrarlo en células normales (Liu, Wiradharma, Gao, Tong, & Yang, 2007). Hay tres isoformas del receptor de folato (FR- $\alpha$ ; FR- $\beta$  y FR- $\gamma$ ). Tejidos sanos y normales expresan muy poco el FR- $\beta$  y de forma insignificante el FR- $\alpha$ . El FR- $\gamma$  solo se encuentra en las células hematopoyéticas. Sin embargo la expresión de FR- $\alpha$  y FR- $\beta$  se ve aumentada en numerosos tumores, lo que les hace factible para la vectorización hacia este receptor. Se ha observado que la conjugación de NP con fólculo rápidamente es internalizada a través de receptores mediados por endocitosis (Blanco et al., 2012).

El polietilen glicol junto con otros polímeros hidrofílicos como son los poloxámeros, polisacáridos o las poloxaminas (Kumar & Lutful, 2014), han sido unidos en la superficie de las nanopartículas para incrementar el tiempo de permanencia en el torrente sanguíneo evitando que sean reconocidas por las proteínas plasmáticas y, como consecuencia, impidiendo la opsonización y eliminación del sistema del organismo (Babu et al., 2014). De esta forma se incrementa la cantidad de fármaco que llega al tumor.

A través de esta vectorización se consigue el incremento de la selectividad del fármaco antitumoral por las células malignas, lo cual está directamente correlacionado con la mejora de la calidad de vida y a supervivencia de los pacientes (Patra & Turner, 2014).

## **2.- BIOMATERIALES**

Los biomateriales se definen como cualquier sustancia o combinación de sustancias no farmacológicas, de origen natural o sintético, diseñadas para actuar interfacialmente con sistemas biológicos, que potencian o sustituyen las funciones de los órganos y tejidos corporales con el fin de evaluar, tratar, aumentar o sustituir algún tejido órgano o función del organismo humano (Williams, 1987) (Langer, Cima, Tamada, & Wintermantel, 1990).

Actualmente, existen numerosos polímeros utilizados en el campo biomédico. Algunos de ellos son estables y se utilizan para aplicaciones permanentes, como polimetilmetacrilato o polietileno. Sin embargo, Kulkarni y sus colaboradores (Kulkarni, Pani, Neuman, & Leonard, 1966) introdujeron en los años 60, el concepto de material bioabsorbible y en los últimos años se ha ido desarrollando los polímeros biodegradables para aplicaciones temporales.

A lo largo del siglo veinte, se ha producido un gran incremento en el número y variedad de polímeros, en sus propiedades y aplicaciones, consiguiendo desarrollar materiales

de gran importancia en la ingeniería. La creciente demanda de materiales biodegradables para su utilización en el campo de la biomedicina ha incrementado el interés en la síntesis de productos con mejores prestaciones y propiedades.

Debido a la gran variedad de polímeros actuales, hay diversos criterios de clasificación: en función de los monómeros (homopolímero, copolímero, terpolímero...), en función del origen (natural, semisintético, sintético) y en función de sus características (biodegradabilidad, biocompatibilidad, hidrofobicidad). Sus principales aplicaciones son:

- Biomateriales para la ingeniería biomédica: con utilidad de reemplazamiento de órganos y cirugía ósea (biocompatibles y biodegradables o permanentes)
- Materiales controladores de la liberación de fármacos: biocompatibles.
- Polímeros sintéticos solubles: con actividad biológica propia.

En este sentido se han diseñado numerosos sistemas con diferentes polímeros (policaprolactona y poliláctico (Perez et al., 2012), alginato y albumina (Martinez et al., 2011), Poly N-isopropylacrylamide (Blanco et al., 2008), quitosano (Chaudhury & Das, 2011) y pectina (Wong, Colombo, & Sonvico, 2011) como materiales controladores de la liberación de fármacos como bupivacaína (Blanco, Bernardo, Teijon, Sastre, & Teijon, 2003), metotrexato (Teijon, Guerrero, Olmo, Teijon, & Blanco, 2009) y 5-fluorouracilo (Sastre et al., 2007). Hay que tener en cuenta una serie de consideraciones y características para que un polímero sea un buen material controlador de la liberación:

- Debe ser biocompatible para poder ser administrado en el organismo
- Químicamente compatible con el principio activo
- Controlar la liberación de forma reproducible
- Características físico – químicas conocidas
- Coste y disponibilidad
- No tóxicos
- Biodegradables

El hecho de que un polímero sea biodegradable, no es una característica imprescindible para su utilidad pero, como ya se ha comentado anteriormente, ha ampliado su uso y por lo tanto, el interés en este tipo de macromoléculas ha incrementado.

Hay algunas otras variables a considerar cuando se trabaja con nanomateriales entre los que se encuentra: tipo de material, tamaño, forma, superficie, recubrimiento, dispersión, aglomeración, agregación, concentración y matriz (Kura et al., 2014).

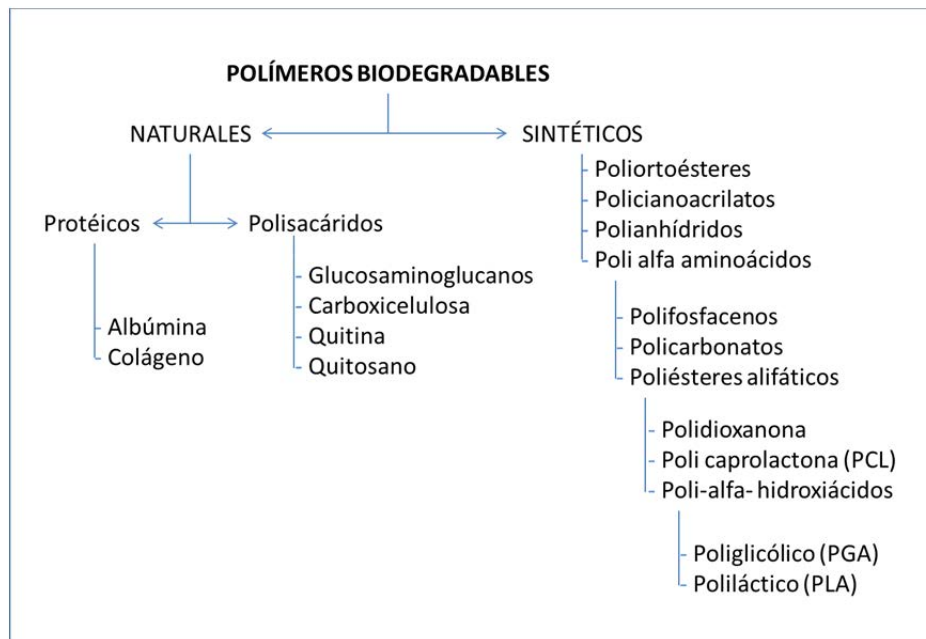
## **2.1.- BIOMATERIALES BIODEGRADABLES**

Estos materiales tienen la capacidad de ser compatibles con el tejido y de degradarse cierto tiempo después de ser implantados, dando lugar a productos que no son tóxicos y que pueden ser eliminados por el organismo o metabolizados por este. Por lo tanto pueden ser definidos como aquellos polímeros que son degradados en un ambiente biológico a través de hidrólisis enzimática y no enzimática y no por procesos de oxidación térmica, fotólisis o radiólisis (Ikada & Tsuji, 2000).

Las principales características que han de considerarse en los materiales biodegradables para poder ser utilizados en aplicaciones clínicas son: la velocidad de degradación, la resistencia mecánica del material, sus sub-productos no han de ser mutágenos, carcinogénicos, antigénicos, tóxicos ni teratogénicos; y lógicamente deben ser antisépticos, esterilizables y biocompatibles con el tejido receptor (Martínez Palau, 2008). Es aconsejable que sean solubles en el medio fisiológico, para que puedan ser aplicados en el organismo humano.

Atendiendo a su origen, los biomateriales biodegradables se pueden ser (*Figura 6*):

- Naturales: son materiales complejos, heterogéneos y difícilmente caracterizables y procesables (Ej.: catgut, colágeno reconstituido, celulosa, quitina, quitosano y albumina)
  
- Sintéticos: pueden ser metales, cerámicas o polímeros y comúnmente se denominan materiales biomédicos (Ej.: poli (ácido láctico), poli (ácido glicólico) y policaprolactona).



**Figura 6:** Clasificación de los tipos de polímeros biodegradables en función de su naturaleza.

En caso particular de los biomateriales poliméricos se pueden clasificar según el tiempo que deben mantener su funcionalidad cuando se aplica como implantes:

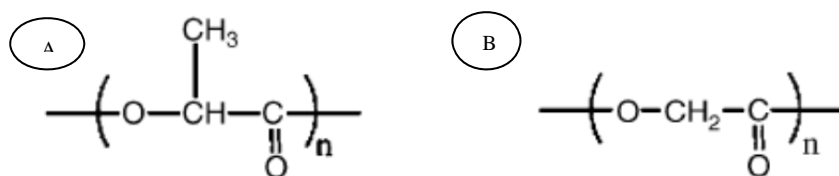
Grupo 1: permanentes → bioestables. Utilizados para sustituir parcial o totalmente un tejido u órganos destruidos como consecuencia de una enfermedad o trauma, de forma permanente.

Grupo 2: permanencia limitada → biodegradable. Utilizados para sustituir durante periodos de tiempo más o menos cortos una funcionalidad que el organismo es capaz de regenerar. La degradación es el mecanismo de elección para su eliminación después de haber finalizado su función.

### 2.1.1.- POLÍMEROS SINTÉTICOS:

Dentro de los polímeros sintéticos, los poliésteres han sido ampliamente estudiados en ingeniería de tejido y como sistemas de liberación controlada. Las ventajas que presentan estos polímeros son su peso molecular, su grado de cristalinidad y la composición de sus monómeros y/o aditivos. La mayoría de los sistemas poliméricos biodegradables aplicados en

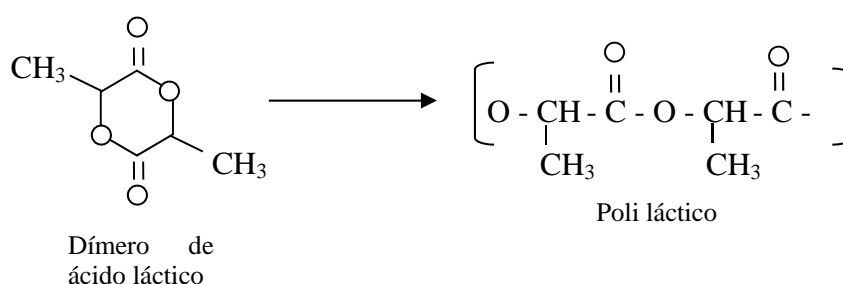
medicina actualmente son poliésteres de los cuales los más ampliamente estudiados son el poli (ácido láctico) (PLA) y el poli (ácido glicólico) (PGA) (Fu et al., 2002) y su copolímeros (Treiser, Abramson, Langer, & Kohn, 2013) (Nair & Laurencin, 2007) (Magnusson, Saeed, Fernandez-Trillo, & Alexander, 2011) (Figura 7). A estas ventajas se le suma su baja inmunogenicidad y toxicidad haciendo de ellos unos vehículos altamente biocompatibles.



**Figura 7:** Estructura química: **A)** poli (ácido láctico) y **B)** poli (ácido glicólico).

El **poli (ácido láctico) (PLA)** es un polímero termoplástico, amorfo o semicristalino que ha sido ampliamente estudiado en aplicaciones como la liberación controlada de fármacos, suturas biodegradables y diferentes implantes para la fijación de fracturas y para la elaboración de dispositivos vasculares.

Se obtienen por la polimerización por apertura de anillo del dímero heterocíclico del ácido láctico (Figura 8). Al presentar isomería óptica se pueden considerar ambos enantiómeros L y D, por lo que D,L PLA es el polímero racémico, amorfo e inactivo, que proporciona una dispersión homogénea de las especies activas dentro de la matriz monofásica, quedando su utilidad centrada en dispositivos de liberación controlada. Los monómeros D y L son semicristalinos. El PLA es más hidrofóbico que el PGA ya que presenta un grupo metilo más en su estructura, viéndose disminuida su velocidad de hidrólisis. Sin embargo presenta una mayor solubilidad en disolventes orgánicos que el PGA. Su bioadsorción se lleva a cabo a través de hidrólisis produciendo ácido láctico.



**Figura 8:** Reacción de polimerización de la lactida.

Presenta una buena biocompatibilidad ya que el ácido láctico es un intermedio en el metabolismo de los carbohidratos en nuestro organismo por lo que el uso de este hidroxácido es generalmente visto como la situación ideal desde el punto de vista toxicológico. Los poliésteres alfa, como el PLA se degrada inicialmente por hidrólisis la cual puede ser acelerada por la presencia de enzimas, produciendo la liberación de sus respectivos monómeros (ácido láctico en este caso). Estos monómeros son incorporados dentro de los procesos fisiológicos a nivel celular, donde continúan su degradación en la ruta metabólica (*Figura 9*).

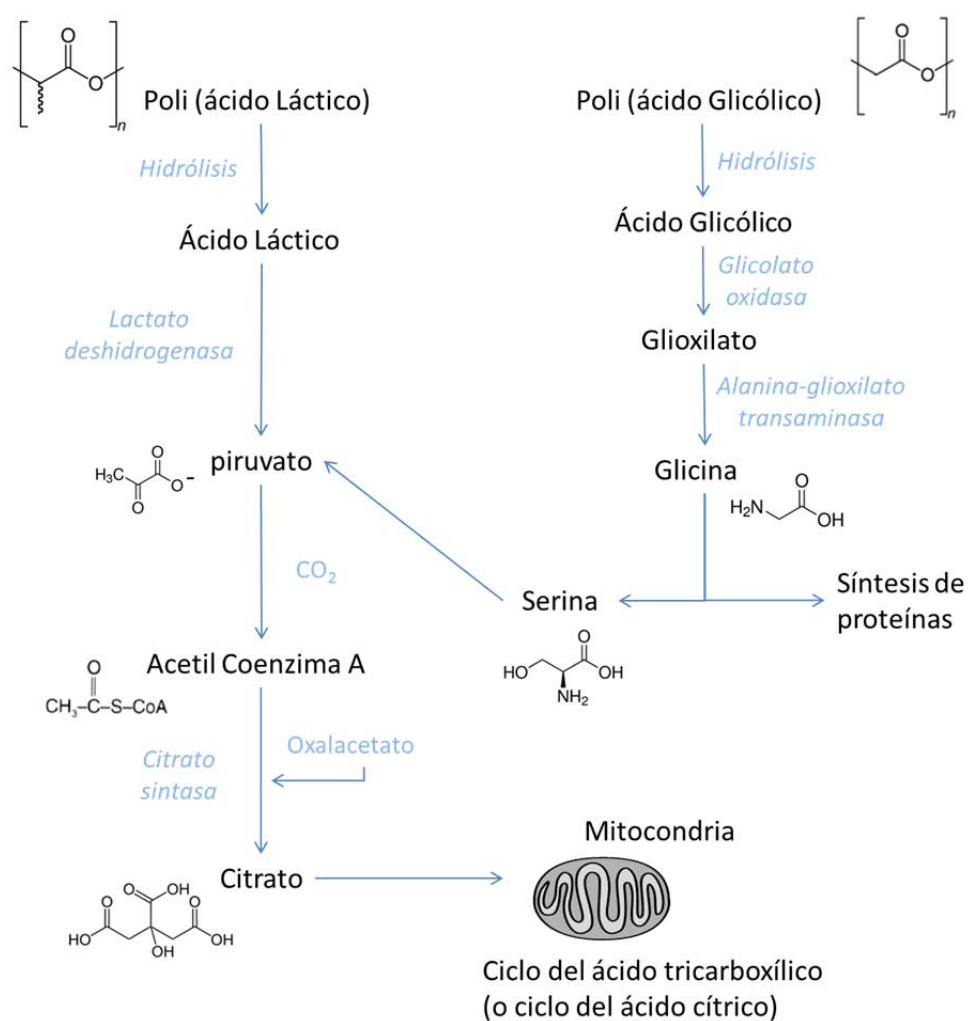
La ruta metabólica del ácido láctico (*Figura 9*) comienza con la transformación de ácido láctico a piruvato por la acción de la enzima lactato deshidrogenasa, una vez convertido en piruvato, éste sufre una descarboxilación oxidativa para producir acetilcoenzima A. Esta molécula puede entrar en el ciclo del ácido tricarboxílico (o ciclo del ácido cítrico), el cual se lleva a cabo a nivel mitocondrial obteniéndose como resultado ATP, por fosforilación oxidativa, más agua y dióxido de carbono, los cuales son eliminados en la respiración y excretados por los riñones (Hollinger, 1983).

El estudio histológico de esta molécula ha puesto en manifiesto que la reacción celular se limita a la activación de macrófagos en el área de implantación, sin que aparezca una reacción vascular aguda persistente (Hooper, Macon, & Kohn, 1998), considerándose por tanto como una molécula con una alta biocompatibilidad.

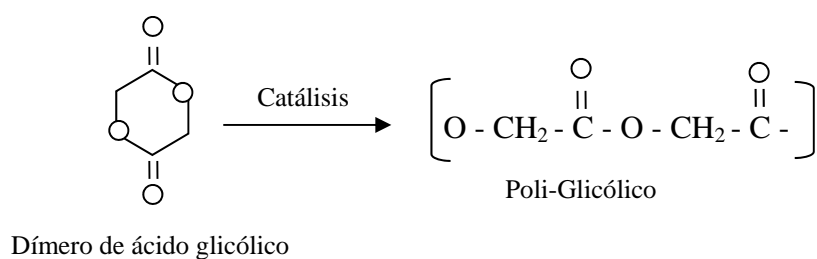
El **poli (ácido glicólico) (PGA)** poliéster lineal alifático más simple, semicristalino, de alto punto de fusión (220-225°C) y baja solubilidad en disolventes orgánicos. Es un material termoplástico rígido de elevada cristalinidad y debido a ello es insoluble en la mayoría de los disolventes orgánicos a excepción de los altamente fluorados.

Mediante la dimerización del ácido glicólico se obtiene el monómero, el cual polimeriza por apertura de anillo (Saehney & Drumheller, 1998) produciendo un material de alto peso molecular y con un porcentaje de monómero residual comprendido entre el 1% y el 3% (*Figura 10*).





**Figura 9:** Ruta metabólica del ácido láctico y del ácido glicólico.

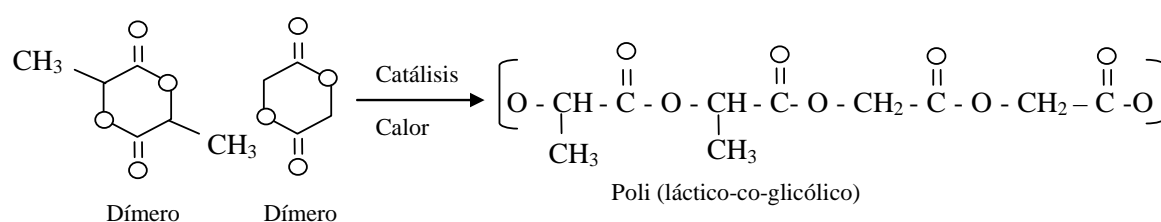


**Figura 10:** Reacción de síntesis del poli (ácido glicólico) (PGA).

Durante la degradación (*Figura 9*), sus metabolitos son productos naturales, lo que le proporciona biocompatibilidad y una absorción a los pocos meses de la implantación. El proceso hidrolítico, activado por los componentes solubles en medio fisiológico, conduce a la liberación del ácido glicólico. Este ácido glicólico liberado, se metaboliza en los peroxisomas sometido a la acción específica de enzimas, como la glicolato oxidasa, se transforma en glioxilato que reacciona con alanina-glioxilato-transaminasa para producir glicina. La glicina es un aminoácido que participa en la biosíntesis de proteínas o en la síntesis de serina, que se transforma en piruvato, el cual, por la transformación en acetil-coA, y se incorpora al ciclo de los ácidos carboxílicos. Estos procesos, por tanto, conducen a la eliminación de los productos de degradación por la vía metabólica, pudiendo incluso ser aprovechados como componentes activos en los ciclos bioquímicos metabólicos clásicos (Hollinger, 1983).

Los **copolímeros** formados con el ácido glicólico y ácido láctico son más fácilmente degradables que los homopolímeros correspondientes (Shen, 1995). Se puede sintetizar por poli condensación o mediante polimerización por apertura del anillo de los correspondientes dímeros heterocíclicos (*Figura 11*). El ácido glicólico reacciona a mayor velocidad por lo que se incorpora de forma más rápida a las cadenas de crecimiento del copolímero (Cowsar, Rice, Gilley, & English, 1985).

El PGA es altamente cristalino mientras que en los copolímeros la cristalinidad disminuye, incrementándose la velocidad de hidrólisis. Por otro lado, la hidrofobicidad del PLA limita la absorción de agua. Los polímeros formados a partir de glicolida y lactida están constituidos por una secuencia al azar de dímeros de glicolato y lactato. Sin embargo es posible obtener copolímeros secuenciales a partir del diéster cíclico constituido por una unidad de lactato y una de glicolato (Dong, Qiu, Gu, & Feng, 2000) esto da lugar a un polímero con la misma fórmula empírica que el contenido a partir de una mezcla al 50% de ambos con una distribución alternante que cambia ligeramente sus propiedades (Augurt & Rosensaft, 1977).



**Figura 11:** Reacción de síntesis del copolímero PLGA poli (láctico-co-glicólico).

El copolímero se degrada a mayor velocidad que los propios homopolímeros dependiendo de la forma y de su composición, de tal forma que el copolímero preparado con relación equimolecular de los monómeros suele mostrar las mayores velocidades de degradación (Reed & Gilding, 1981) (Jiang & Schwendeman, 2001) (Auras, Lim, Selke, & Tsuji, 2010).

Una de las desventajas de los poli  $\alpha$ -hidroxiácidos, en general, es que sus productos de degradación, monómeros de ácidos láctico y glicólico (Bittner et al., 1998), dan lugar a una disminución del pH, lo cual puede acelerar el proceso de degradación del propio polímero (Dunne, Corrigan, & Ramtoola, 2000) por autocatálisis e inducir una respuesta inflamatoria (Pachence & Kohn, 1997). Este problema puede solventarse mediante la optimización de metodologías de proceso encaminadas a favorecer una rotura gradual.

Tanto los polímeros naturales como los sintéticos presentan una serie de características, ventajas e inconvenientes, destacables en cada uno de ellos, que van a determinar su uso como materiales controladores de la liberación de principios activos. En la *Tabla 1* se esquematizan dichas ventajas y desventajas.

**Tabla 1:** Ventajas y desventajas de los polímeros naturales y sintéticos.

POLÍMEROS	VENTAJAS	DESVENTAJAS
NATURALES	Fundamentalmente hidrofílicos	Posible reacción inmunogénica
	Biocompatibles	Alta variabilidad
	Gran afinidad de unión celular	Bajo control de las especificaciones
	Buena disponibilidad	Menor control de la degradación
		Corto perfil de liberación
SINTÉTICOS	Diseño personalizado	Necesidad de ligandos
	Fácil modificación	Síntesis compleja en ocasiones
	Perfil de liberación preciso	Fundamentalmente hidrofóbicos
	No inmunogénicos	Difícil adaptación al escalado
	Control fácil de propiedades	

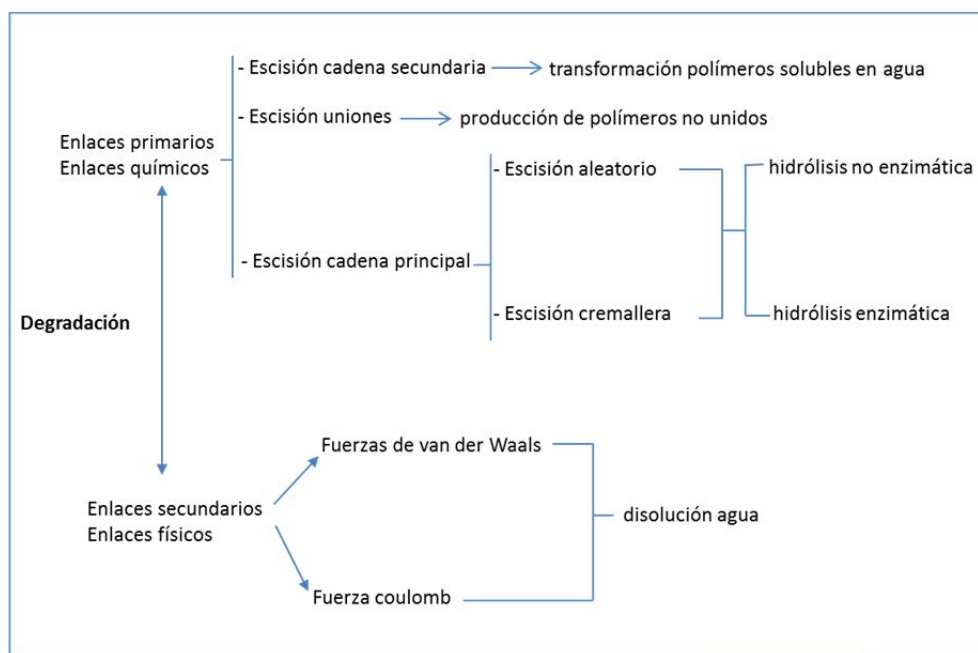
El PLGA como polímero ha sido aprobado por la FDA (U.S. Food and Drug Administration) y EMA (European Medicine Agency) para su aplicación en la liberación de fármacos por su biodegradabilidad, biocompatibilidad con el fármaco, cinéticas de degradación adecuadas (Mirakabad et al., 2014).

## 2.2.- MECANISMOS DE BIODEGRADACIÓN DE LOS POLÍMEROS

La biodegradación es una de las características que se busca, en algunas aplicaciones, en los biomateriales cuando se utilizan como sistemas de liberación controlada de fármacos ya que gracias a ella no necesitan ser retirados después de la liberación del fármaco comparado con los biomateriales no biodegradables (Dhana Lekshmi, Poovi, Kishore, & Reddy, 2010), que en muchas ocasiones requeriría la intervención quirúrgica. Además los sistemas no biodegradables si no son eliminados se pueden llegar a acumular en las células fagocitarias mononucleares como es el caso de hígado, bazo llegando a producir una potencial toxicidad (Owens & Peppas, 2006).

Pueden degradarse parcialmente por alteración de su estructura química, lo cual conlleva una pérdida de propiedades específicas o totales. Generalmente producen una mineralización completa con producción de CO<sub>2</sub>, agua, sales minerales y biomasa, aunque también pueden quedar fragmentos (oligómeros) resistentes a la degradación.

La mayoría de las degradaciones tienen lugar a través de escisiones de las cadenas principales o cadenas laterales de la molécula polimérica, inducidas por activación térmica, oxidación, fotólisis, radiólisis, o hidrólisis enzimática o no enzimática (*Figura 12*). Los enlaces sensibles a la degradación en el organismo son: acetales, ésteres, orto-ésteres, amidas, y enlaces glucosídicos.



**Figura 12:** Esquema de los posibles mecanismos de degradación polimérica.

Los mecanismos por los que se puede llevar a cabo la degradación pueden ser: bioerosión e hidrólisis. La velocidad de degradación depende de la hidrofília de los polímeros y de la accesibilidad de sus enlaces hidrolíticamente inestables a los fluidos corporales. Otro factor que influye es el acceso que tenga las enzimas u otras moléculas capaces de romper estos enlaces químicos. Por lo tanto, la higroscopicidad de los materiales, su morfología, cristalinidad y peso molecular serán parámetros clave en la cinética de degradación del polímero (Stohelin & Liedtke, 1995) (Hayashi, 1994), en la pérdida de sus propiedades mecánicas y de peso durante el tiempo de implantación. Existen varios factores que pueden influir en la velocidad de degradación (Peppas & Langer, 1994) (Brown, Mason, Jockisch, Hastings, & Moet, 1990) como el tipo de enlace químico, el pH, la composición del copolímero y la higroscopicidad.

El medio fisiológico humano presenta unas condiciones en las que se puede producir con facilidad procesos hidrolíticos. Existen diversos factores y sustancias en el organismo que van a influir e intervienen en la degradación polimérica como son el agua, sales, enzimas y células fagocitarias. El agua es el agente más responsable de la biodegradación de los polímeros en el organismo. Los electrolitos, acidez o basicidad también van a tener un efecto importante tanto en la degradación hidrolítica como oxidativa (Moiseev & Zaikov, 1987). La interacción de sales con los polímeros depende de la solubilidad del propio polímero en la solución salina. En cuanto a las enzimas no pueden penetrar y difundirse en un implante polimérico, por lo que su actividad se desarrolla en la superficie o cuando se ha producido la fragmentación. Los fragmentos pueden ser ingeridos por fagocitos formando vacuolas digestivas de pequeño tamaño y atacados por enzimas lisosomales de gran actividad como son la hidrolasa y oxidasa, que destruyen los polímeros fácilmente (Li, Deng, & Huang, 2001). Para que todos estos procesos puedan tener lugar, los polímeros han de presentar enlaces hidrolizables. Los polímeros con heteroátomos en la cadena polimérica principal como los poliésteres, poli alfa aminoácidos, poliamidas y poliuretanos son susceptible de la hidrólisis en condiciones fisiológicas (Williams, 1992). Cuando la degradación afecta tanto a la superficie como a la estructura interna del sistema estamos ante una bioerosión homogénea, mientras que cuando solo afecta a la superficie del sistema es una bioerosión heterogénea (*Figura 13*).

En la hidrólisis, en una primera fase, el agua penetra en los dominios amorfos del material atacando los enlaces químicos y convirtiendo las cadenas poliméricas en fragmentos más cortos y solubles en agua. En esta primera etapa, el material no pierde sus propiedades porque la matriz del material está soportada aún por las regiones cristalinas. A medida que

avanza la hidrólisis, el agua empieza a fragmentar el material con la consecuente reducción del peso molecular dando lugar a la pérdida de propiedades físicas (Blanco, Sastre, Teijon, Olmo, & Teijon, 2006).

Esta degradación no solo es importante a tener en cuenta para la eliminación y asimilación del sistema en el organismo, sino que tiene gran relevancia en la liberación del principio activo, llegando a ser en algunas ocasiones el mecanismo limitante que lo controla.

## **2.3.- MECANISMOS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS DE LOS SISTEMAS POLIMERICOS**

Hay diversos mecanismos definidos por los cuales una sustancia es expulsada (*Figura 13*) de un sistema de liberación controlada (Heller & Hoffman, 2004):

1.- Sistemas controlados por la penetración e agua en el sistema: se diferencian los sistemas hinchables y los sistemas osmóticos

- Sistemas hinchables (Langer & Peppas, 1983). En estos sistemas controlados por el hinchamiento, el principio activo está disperso en un polímero hidrofílico que pasa de un estado rígido a vidrioso cuando es hidratado, permitiendo la salida del fármaco a través de la difusión. Es importante distinguir que en estos sistemas la liberación es controlada por el hinchamiento y no por la difusión.

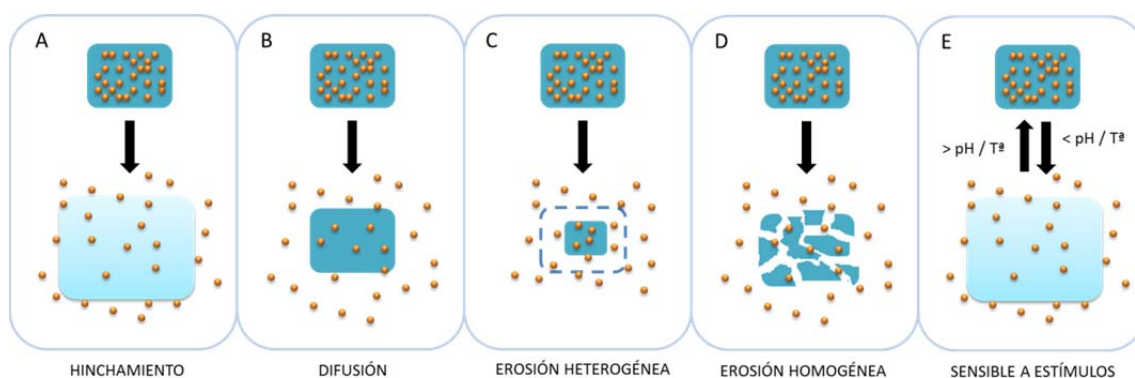
- Sistemas Osmóticos (Theeuwes & Yum, 1976): en estos sistemas un agente osmótico incrementa la presión osmótica en el interior del sistema cuando se disuelve en el agua que entra favoreciendo la salida del fármaco.

2.- Difusión: en estos sistemas el principio activo es capaz de pasar a través del material controlador para salir al exterior del sistema. En este caso afecta la estructura del sistema (reservorio o matricial o la presencia de poros) (Sun et al., 2014).

3.- Erosión: A medida que el sistema se va degradando el principio activo se va liberando.

4.- Sistemas inteligentes: son sistemas sensibles que responden a estímulos específicos para liberar el principio activo como puede ser la temperatura, disolvente, pH e iones.

En algunas ocasiones un mecanismo tiene lugar de forma independiente, mientras que en otras ocasiones varios mecanismos pueden tener lugar de forma simultánea o consecutiva en un mismo sistema. Esto dependerá de los polímeros que formen el sistema y por lo tanto determinará la salida del principio activo.



**Figura 13:** Mecanismos de liberación del fármaco desde sistemas poliméricos. **A)** sistemas hidrofílicos en el que el polímero sufre un hinchamiento. **B)** Sistema matricial en el que el fármaco está disperso en una matriz polimérica y se libera por difusión. **C)** La liberación es controlada por la superficie erosionable cuando la erosión es progresiva hacia el interior. **D)** La liberación es controlada la erosión que ocurre en todo el material polimérico a la vez (erosión bulk). **E)** Sistemas inteligentes que liberan en función a la sensibilidad frente a estímulos del medio.

## 2.4.- BIOCOMPATIBILIDAD

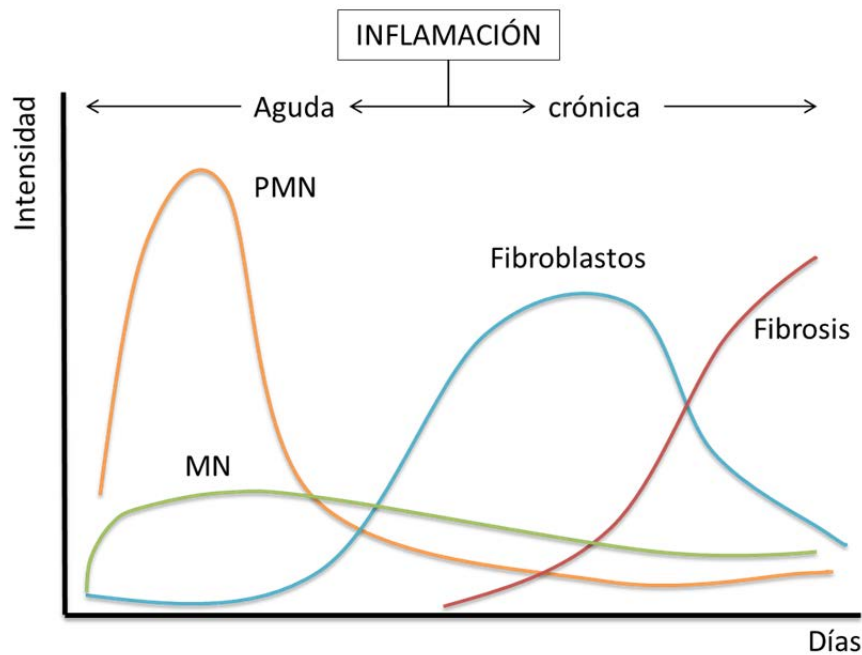
La biocompatibilidad y biofuncionalidad son las características más importantes que presentan los biomateriales y ha sido ampliamente estudiada desde que el primer material fue introducido en un organismo (Sun et al., 2014). Inicialmente se despertó un gran interés por las materiales inertes, considerándolos como sustancias que no presentaban ningún tipo de interacción con el organismo y por lo tanto no desencadenaban ninguna reacción. Sin embargo, a medida que nuevos materiales fueron surgiendo, han ganado más relevancia aquellas sustancias que interactúan con el organismo pero de forma positiva desarrollando una reacción controlable consiguiendo un efecto deseable. Por tanto, todos biomateriales utilizados en la tecnología biomédica se debe de evaluar su seguridad y eficacia (Williams, 2015) independiente de su utilidad. La habilidad del material para producir una adecuada respuesta del hospedador en una situación en concreto es lo que va a determinar la biocompatibilidad y La biocompatibilidad implica un no desencadenamiento de una respuesta inmunológica en el organismo, interactuando con el hospedador de forma no tóxica,

controlable y predecible y sin ningún efecto adverso (Williams, 2015). En este sentido todo aquel material que no produce una reacción inmunológica, trombogénica, carcinogénica o tóxica se considera un material con una elevada biocompatibilidad (Sun et al., 2014).

Cuando una sustancia es introducida en el organismo, ya sea de origen natural o sintético, ésta es considerada como una sustancia o cuerpo extraño (Chauvel-Lebret, Auroy, & Bonnaure-Mallet, 2001) y como consecuencia se desarrolla una respuesta (*Figura 14*). Entre la respuesta a un cuerpo extraño se encuentra la lesión, interacciones con componentes de la sangre, formación de la matriz provisional, inflamación aguda, o crónica, granulación, desarrollo de tejido, reacción de cuerpo extraño, fibrosis/ desarrollo de cápsulas fibrosas (Anderson, Rodriguez, & Chang, 2008). En este sentido, la biocompatibilidad se considera como un conjunto de reacciones entre el cuerpo extraño y el organismo con finalidad de rechazar o asimilar la sustancia introducida y establecer un equilibrio interno (Fournier, Passirani, Montero-Menei, & Benoit, 2003). Hay materiales que inicialmente pueden presentar una mínima o inexistente toxicidad pero pueden incrementar su efecto nocivo cuando son degradados o procesados por el organismo (Nie, 2010), debido a que sus productos de degradación no biocompatibles. Por ello no solo hay que considerar el material de partida sino también sus posibles subproductos y la reacción completa con el organismo.

Esta biocompatibilidad es importante no solo para que el biomaterial no produzca ningún daño al hospedador sino también porque una reacción del tipo inmunogénica, tóxica, trombogénica o incluso carcinogénica puede afectar a la liberación del fármaco y por tanto a la efectividad del sistema de liberación controlada. Otro aspecto a tener en cuenta es la composición química de la superficie del biomaterial ya que condiciona la susceptibilidad a la biodegradación, y tendrá impacto sobre el comportamiento de los macrófagos como adhesión, apoptosis, fusión o secreción de citoquinas (Anderson et al., 2008). Sin embargo la biocompatibilidad no solo va a depender del material, sino que también varía en función del lugar donde entra en contacto y su aplicación (Williams, 2008), es por ello que a pesar de usar biomateriales ya estudiados y conocidos es importante volverlos a evaluar para la aplicación diseñada.





**Figura 14.** Respuesta inflamatoria del organismo humano ante la implantación de un dispositivo o cuerpo extraño; PMN: leucocitos polimorfonucleares y MN: leucocitos mononucleares.

La compatibilidad con el organismo cien por cien no siempre se consigue, sobre todo con los biomateriales son de origen natural, los cuales son generalmente inmunogénicos. Incluso los biomateriales de origen sintético, al ser un cuerpo extraño, siempre pueden llegar a producir una mínima reacción. Para evitar este efecto hay una técnica muy utilizada, *la pegilación*, que no es más que recubrir la partícula o sistema con polietilenglicol (PEG), el cual, entre otras muchas cosas se ha visto que disminuye drásticamente la respuesta inmunitaria (Chen et al., 2008). La biocompatibilidad de las nanopartículas va a depender de la estructura y propiedades superficiales y otros muchos factores (Sun et al., 2014) como el material del que esté formado.

### **3.- APLICACIÓN DE LOS SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER**

El cáncer es causado por un crecimiento incontrolado y por consiguiente una propagación de las células anormales. Es una enfermedad que amenaza la salud humana y es una de las causas más importantes de muerte en nuestros días (Kumar & Lutful, 2014). El

mecanismo de formación y expansión del cáncer todavía no se conoce del todo, diversos factores, tanto externos (radiación, infecciones, tabaco, medicamentos,...) como internos (mutaciones metabólicas, hormonas, condiciones inmunes,...) se creen que son relevantes en esta patología. Estos factores pueden actuar simultáneamente o secuencialmente para iniciar o promover la carcinogénesis. Hay una laguna en la cura total del cáncer. Por lo que, actualmente, una de las metas es el desarrollo de tratamientos dirigidos a la remisión y/o paliación. Se dice que un cáncer ha remitido cuando todas las evidencias clínicas de cáncer han desaparecido, aunque esto no significa que, a pesar de todo, no quede un foco microscópico de células cancerígenas remanentes.

Un tratamiento efectivo incluye la cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal (Kumar & Lutful, 2014) e inmunológica. Cada una de estas modalidades de tratamiento tiene sus ventajas y desventajas y la combinación de todas ellas es normalmente necesaria para conseguir los resultados más efectivos. La detección precoz, la cirugía radical del tumor, radioterapia y quimioterapia efectiva y otros tratamientos son factores críticos que determinan el pronóstico del paciente. Aunque es muy difícil predecir quien va a padecer cáncer, hay claras evidencias de que la incidencia del cáncer puede ser reducido controlando el tabaco y alcohol, obesidad y la exposición al sol, nutrición apropiada, actividad física y realizando exploraciones (American Cancer society, 2002).

La extirpación quirúrgica de un tumor y su tejido adyacente afectado es normalmente efectiva y considerada como uno de los tratamientos primarios para tumores suficientemente grandes para ser manipulados. Sin embargo, es complicado ser riguroso en la cirugía y normalmente es inevitable que se queden células residuales afectadas. Hay que tener en cuenta que la cirugía puede tener un efecto indeseable en el cambio del ritmo del crecimiento del resto de células cancerosas mediante la producción o provocación de un rápido proceso metastásico. La terapia multimodal que utiliza radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia y otras formas de tratamiento sigue sugiriendo mejores propiedades para erradicar células cancerosas metastásicas o por lo menos remitirlas. Anteriormente, en 1957, ya se observó el efecto beneficioso que proporcionaba la terapia multimodal, Shapiro y Fugman (Shapiro & Fugmann, 1957) demostraron en ratones con carcinoma que el porcentaje de curación es superior cuando se combina la cirugía y la quimioterapia.

La quimioterapia, en cáncer, es entendida como el uso de agentes quimioterápicos dirigidos a la muerte o control de las células cancerígenas. Estos agentes son, normalmente,

tóxicos e incluso pueden poner en peligro la vida de la persona. Este tratamiento para el cáncer fue utilizado por primera vez en 1950, cuando las mostazas nitrogenadas, usadas por entonces como gas de guerra, fueron descubiertas como buenas inhibidoras del crecimiento tumoral. Debido a su extrema toxicidad y a pesar de su eficacia en la quimioterapia, no fueron muy utilizados hasta los años 60. A principios de los años 70 la quimioterapia se desarrolló muy rápidamente para proporcionar, junto con otros tratamientos, un promedio de curación de algunos tipos de cánceres o como mínimo aumentar la esperanza de vida. Ha habido ciertos agentes anticancerosos vitales para ser usados en clínica, algunos son químicamente sintéticos y otros extractos naturales.

La efectividad de la quimioterapia depende de varios factores entre los que se encuentra el fármaco utilizado, condiciones del paciente, dosis, forma y pauta terapéutica, entre otros. Hay que tener en cuenta que muchos de los fármacos anticancerígenos presentan una elevada hidrofobicidad (Sun et al., 2014), por consiguiente no son solubles en agua ni en la mayoría de los disolventes. Como consecuencia, y para solucionar esto, se usan adyuvantes, los cuales producen diversos efectos adversos en el paciente. La biodisponibilidad es otro de los problemas que plantean a la hora de administrarlos junto con la baja especificidad por la diana terapéutica, por la cual aparecen la mayoría de los efectos secundarios como son la mielosupresión, inmunosupresión, mucositis, alopecia, órganos disfuncionales, anemia o trombocitopenia (Kumar & Lutfi, 2014).

Es necesario exponer a las células cancerosas a una concentración suficientemente elevada de fármaco durante un tiempo necesario. Generalmente se cree que las exposiciones de duración mayor a menor concentración son más eficaces que aquellas en las que el tiempo es menor pero la dosis es mayor (Wermuth, 2002). Todo esto ha conducido al concepto de “liberación controlada”, en base a esta idea, una cantidad de fármaco es encapsulado, adjuntado, incorporado o mezclado con una sustancia transportadora (carrier) desde donde va a liberar el fármaco, en la zona deseada durante un tiempo prolongado, mediante mecanismos como difusión, erosión / degradación, o hinchamiento del material. El objetivo del tratamiento del cáncer es acabar con un mayor número de células tumorales sin afectar a las células sanas, sin embargo la habilidad del fármaco para alcanzar los lugares específicos del organismo necesita mejorar, en este sentido los sistemas de liberación nanopartículas son una gran alternativa (Calixto et al., 2014).

El problema que plantea la toxicidad del fármaco usado en la terapia del cáncer es que no solo afecta a células malignas o afectadas sino que también mata o afecta a células sanas, sin discriminar entre unas y otras. Son más efectivos en las células cancerosas puesto que su velocidad de proliferación es superior y, por lo tanto, esto proporciona cierta especificidad. Sin embargo, hay células en el organismo que tienen un mayor ciclo celular de forma fisiológica, como son las células de la médula ósea, epitelio intestinal y folículo piloso, en donde la proliferación celular rápida es necesaria y como consecuencia son lugares diana de los antineoplásicos, generando efectos adversos (Zhao & Rodriguez, 2013). Al introducir el fármaco en un sistema polimérico este queda recluido en su interior y solo es liberado en las proximidades del tumor evitando así el uso de adyuvantes y su acción mortal en las células sanas. Las nano y micro partículas pueden controlar y dirigir la liberación del fármaco encapsulado y así aumentar la eficacia y disminuir los efectos adversos (Langer, 2000).

Otro problema que se plantea es la efectividad de la quimioterapia, puesto que las células cancerosas han desarrollado resistencia a los antineoplásicos. La resistencia se divide en tres categorías en función del mecanismo.

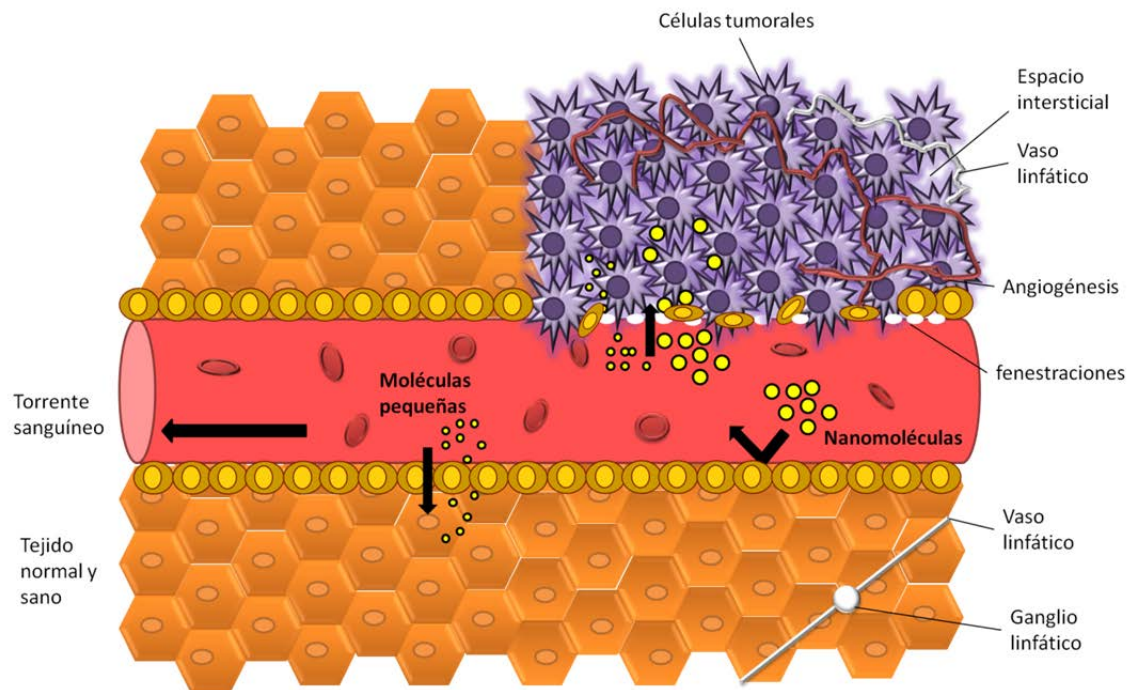
- 1.- Resistencia farmacocinética: debido a la baja concentración de fármaco en el tumor.
- 2.- Resistencia cinética: debido a la presencia solo de una pequeña fracción de células expuestas o susceptibles a ser expuestas.
- 3.- Resistencia genética: debido a la bioquímica de las células tumorales.

Los mecanismos de resistencia desarrollados por los tumores se manifiestan como alteraciones enzimáticas específicas, regulación de la apoptosis o mecanismos de transporte como la glicoproteína P. La glicoproteína P (P-gp) es una proteína que pertenece a la familia ABC-transportadoras (Bogush et al., 2010) y encuentra sobre-expresada en la membrana de las células MDR (resistencia múltiple a fármacos). En distintos tejidos se ha encontrado formas inducibles de expresión de P-gp. La función normal de esta glicoproteína todavía no se ha establecido con claridad pero si se conoce que se encarga de liberar a la célula de sustancias tóxicas (Gatmaitan & Arias, 1993). Se ha demostrado que actúa como una bomba dependiente de energía (ATP), que saca al exterior de la célula el fármaco, evitando así que se acumule y

por tanto que actúe en el interior de la célula, perdiendo toda eficacia el tratamiento (Feng & Chien, 2003) (Sun et al., 2014). Las micro/nanoesferas gracias a su tamaño reducido y sus características superficiales son capaces de introducirse en la célula y saturar la P-gp, no solo porque el fármaco se encuentra unido todavía al polímero sino que también es capaz de adherirse a la pared celular, eliminando la resistencia al permanecer en el interior celular (Vauthier, Dubernet, Chauvierre, Brigger, & Couvreur, 2003). Por lo que estos hallazgos ponen en manifiesto que la presencia del conjunto polímero-fármaco puede contribuir a favorecer la entrada del fármaco al interior de la célula y superar, o al menos disminuir la resistencia múltiple a fármacos (MDR) de algunos fenotipos de células cancerosas.

La resistencia a fármacos (MDR multi drug resistance) se puede desarrollar en contra de múltiples fármacos antineoplásicos con ciertos tipos de estructura molecular (Patra & Turner, 2014). Una solución, muy común entre la clínica oncológica actual, a esta resistencia es la combinación de quimioterapia, es decir, el uso de distintos agentes anticancerígenos a la vez en una misma terapia, a pesar de las inmensas interacciones que se producen entre los fármacos, produciéndose tanto sinergismo como antagonismo (Tedjarati et al., 2002).

Otro de los problemas a solucionar es la barrera microcirculatoria que crea el tumor a su alrededor, la cual el fármaco ha de superar para poder llegar a las células tumorales. Las moléculas terapéuticas han de introducirse dentro del vaso sanguíneo del tumor, cruzarlo, y pasar al intersticio para finalmente migrar a través del intersticio hasta las células. Los tumores presentan regiones necrosadas o con hemorragias así como regiones densamente vascularizadas para poder adquirir los nutrientes que necesitan para su crecimiento incontrolado. Estos vasos sanguíneos tumorales desarrollados a partir de la angiogénesis, presentan importantes anormalidades (Patra & Turner, 2014) con respecto al resto de vasos del organismo, entre las que se encuentra una elevada proporción de células endoteliales en proliferación, alta tortuosidad, hiperpermeabilidad y deficiencia de pericitos (*Figura 15*) (Jain, 2001). A esto se le suma el deterioro del sistema linfático en el interior tumoral lo que impide la difusión normal de las moléculas favoreciendo la retención y el acúmulo de las mismas en el interior tumoral (Peer et al., 2007). Este fenómeno es conocido como el efecto de incremento de la permeación y retención (EPR) favoreciendo la acción de los nanosistemas por vectorización pasiva en el tumor y no sobre otros tejidos sanos (Liu, Lau, Varma, Kairdolf, & Nie, 2010).



**Figura 15:** Características anatómicas y fisiológicas de un tejido normal y tumoral.

Las nanopartículas tienen un tamaño tan pequeño que permite el paso intracapilar y transcapilar y proporcionan una superficie apta para ir liberando el fármaco y tener una respuesta óptima al tratamiento (Ahsan, Rivas, Khan, & Suarez, 2002) (Dellacherie, Gref, & Quéllec, 2001). El transporte macromolecular se puede llevar a cabo a través de los microsomas tumorales y puede ocurrir a través de las uniones interendoteliales y canales transendoteliales, fenestraciones y organelas vasculares, vesiculares ya que se ha visto que el tamaño de poro se encuentra entre 380 nm y 780 nm (Hobbs et al., 1998). Las microesferas tienen un tamaño de 1 a 250 micrómetros, sin embargo el de las nanopartículas oscila entre 10 a 1000 nm (Mundargi, Babu, Rangaswamy, Patel, & Aminabhavi, 2008) por lo que la tendencia es a utilizar las nanopartículas, de menor tamaño y mejor accesibilidad.

Los sistemas de liberación controlada son especialmente útiles para fármacos cuya vida media en plasma es corta, de tal forma que estos sistemas protegen al fármaco de la degradación y transformación dentro del organismo. Además muchos de estos fármacos causan efectos adversos sistémicos dosis dependiente (Schimmel, Richel, van den Brink, & Guchelaar, 2004) que se ven disminuidos al no entrar en contacto sistémico y quedar reducido en el interior de la partícula.

#### **4.- TAMOXIFENO**

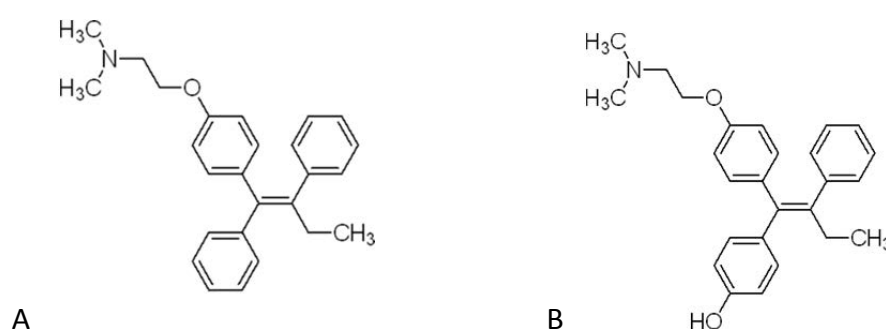
Los estrógenos son hormonas esteroideas derivadas del colesterol producidas y secretadas por los ovarios. Además de la función esencial que desempeñan estas hormonas estrogénicas en la reproducción en la mujer, presenta varias respuestas en las células, incluyendo la diferenciación de los tejidos, morfogénesis, actividad mitogénica y desarrollo de las glándulas mamarias. Son hormonas beneficiosas en la regulación de la densidad mineral del hueso, en el balance osteoclasto/osteoblasto, en la prevención de ateromas plaquetarios, y en el sistema nervioso. Pero hay que destacar que están implicados en la oncogénesis y mantenimiento del crecimiento tumoral. La utilidad de la administración de estrógenos en la medicina es variada: como anticonceptivo, terapia de reemplazamiento hormonal durante la menopáusia y en cánceres dependientes de hormonas (Ameller, Legrand, Marsaud, & Renoir, 2004).

El cáncer de mama es el cáncer más frecuente en mujeres en todo el mundo. A pesar del aumento en su incidencia, hay una disminución en la mortalidad gracias al tratamiento precoz y los nuevos avances en la medicina. Para reducir la reaparición y la mortalidad del cáncer de mama existen dos tipos de terapias sistémicas adyuvantes que se llevan usando en los últimos 20 años; la quimioterapia mediante la combinación de fármacos citotóxicos y la terapia hormonal, privando a las células cancerosas de estrógeno. Estas modalidades terapéuticas son complementarias y son utilizadas secuencialmente en el tratamiento de tumores que expresan receptores hormonales (Widakowich et al., 2007).

El papel endógeno de los estrógenos está demostrado que se encuentra implicado, en algunos casos, en el apoyo del desarrollo y crecimiento del carcinoma de mama. Siempre que haya razones claras y se demuestre dicha implicación, se puede diseñar estrategias terapéuticas, que impidan la acción de muchas hormonas sobre células malignas (cancerosas) y pre-malignas. Existen dos estrategias fundamentales:

- Inhibir la síntesis de estrógenos: mediante inhibidores de la aromatasa (exemestano, letrozol, anastrozol (American Cancer society, 05/2015) (Inhibir la acción de los estrógenos: mediante componentes que interaccionen con los receptores estrógenicos (tamoxifeno y raloxifeno).

Como anti-estrógenos nos podemos encontrar anti-estrógenos puros o moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERMs) que actúan bloqueando el efecto del estradiol (E2) evitando que produzca algún efecto estrogénico por sí mismo. Sin embargo, se ha observado que en algunas líneas tumorales, estas sustancias bioactivas se comportan como inductores de la transcripción a través de la vía de la proteína AP1 (Kushner et al., 2000) teniendo un efecto negativo al potenciar el crecimiento tumoral en otros lugares del organismo. Así, para anular este efecto negativo, la administración de estas moléculas requiere, en muchos casos, una vectorización específica.



**Figura 16:** A) Fórmula molecular del tamoxifeno. (Z)-2-[4-1,2-difenilbut-1-enil]fenoxi]-N,N-dimetil.tanamina. B) Fórmula molecular 4-hidroxitamoxifeno

La terapia endocrina es el tratamiento de elección en cánceres que responden a hormonas y los que primero se usan clínicamente son los SERMs. El tamoxifeno (Figura 16) ha sido el mayor representante de esta familia SERMs desde su introducción en la clínica en los años 70 y es el fármaco de primera elección para el tratamiento de cáncer de mama en las últimas décadas, tanto en mujeres pre y postmenopáusicas (Maji, Dey, Satapathy, Mukherjee, & Mondal, 2014).

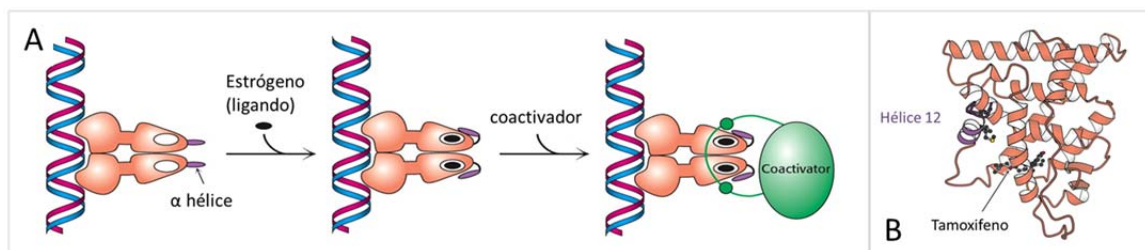
Este fármaco ha tenido un pronunciado efecto en la supervivencia de pacientes con cáncer de mama. El tamoxifeno, como otros SERMs, se comporta como un anti-estrógeno en mama mientras que ejerce un efecto estrogénico en hueso, sistema cardiovascular y en la regulación de la circulación de lipoproteínas de baja densidad (LDL). El intervalo de actividad del tamoxifeno va desde antagonista total en mama a agonista parcial en el útero puesto que ahí actúa a través de la vía de la AP1, pero no en células tumorales mamarias. Esto corrobora que el tamoxifeno tiene efectos beneficiosos (efectos agonistas en la densidad del hueso y el perfil lipídico en suero) y efectos negativos pudiendo produciendo cáncer endometrial (Early breast cancer trialists' collaborative group, 1992). Este efecto opuesto y negativo en el útero refuerza la idea de la necesidad de nuevas formas de administración que proporcionen una



vectorización hacia la mama potenciando el efecto anti-estrogénico e impidiendo el efecto estrogénico en el útero.

Se ha probado a diseñar varias formulaciones biodegradables e inyectables que contienen estos SERMs o anti-estrógenos puros. Estas formulaciones representaron las primeras formas de liberación controlada con anti-estrógenos y han demostrado una evaluación biológica satisfactoria en modelos animal (Ej. PEG- policaprolactona- tamoxifeno, PEG-PLA-tamoxifeno) (Ameller et al., 2004).

Los estrógenos son moléculas hidrofóbicas que difunden fácilmente a través de las membranas celulares, y una vez dentro, se unen a proteínas receptoras específicas que forman una amplia familia de receptores (receptores nucleares de hormonas). Los receptores nucleares de hormonas presentan dos dominios esenciales: un dominio de unión al DNA en la parte central de la secuencia y un dominio de unión al ligando. Este último dominio se pliega adoptando una estructura dispuesta en tres capas. Al unirse el ligando (estrógeno) a la cavidad hidrofóbica situada en el centro, este dominio cambia de conformación (se repliega la hélice 12) permitiendo la unión del coactivador que en muchos casos son enzimas que catalizan las reacciones que conducen a las modificaciones en la cromatina y en el DNA (*Figura 17*).

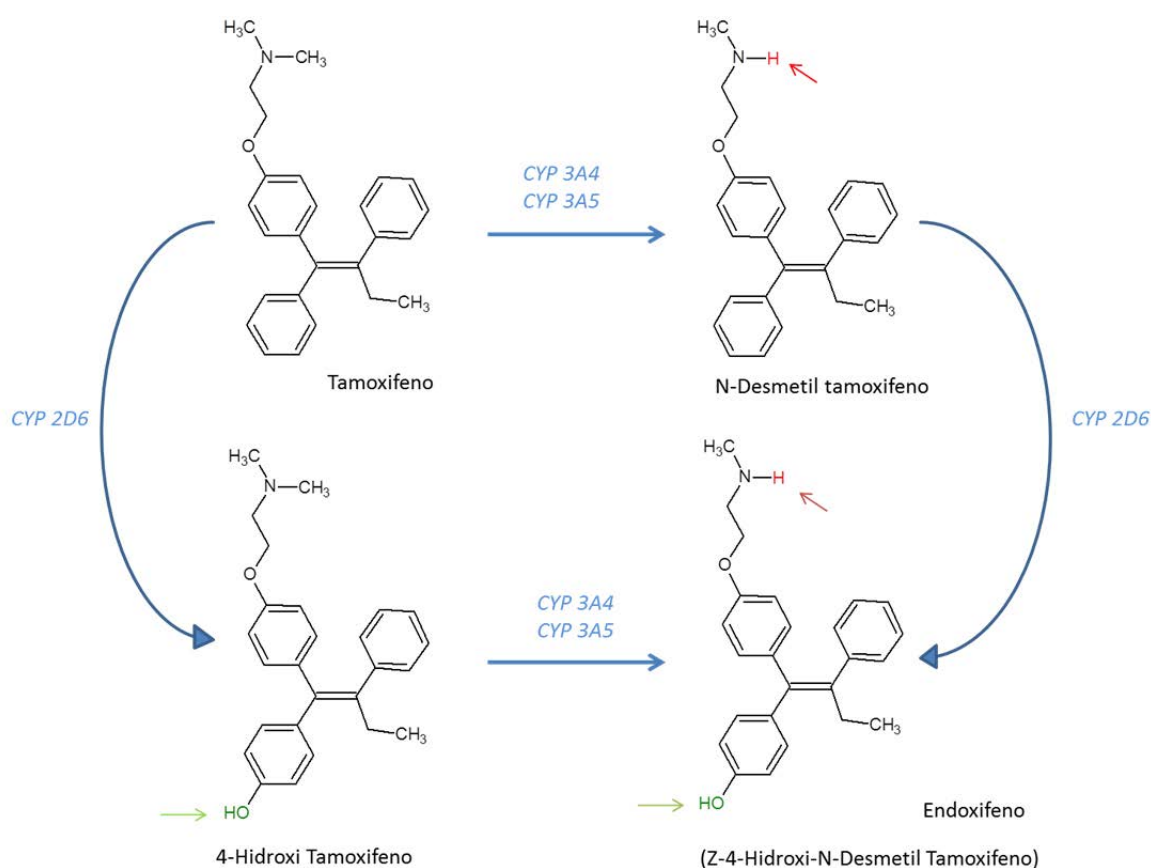


**Figura 17:** A) Unión del ligando al receptor nuclear de hormonas y del coactivador. B) Unión del tamoxifeno al receptor nuclear de hormonas.

El tamoxifeno (TMX) como antagonista estrogénico (Haldosen, Zhao, & Dahlman-Wright, 2014) actúa a nivel de los receptores nucleares de hormonas en forma de 4-hidroxitamoxifeno (*Figura 16*) y se une a la cavidad que normalmente es ocupada por el estrógeno. Sin embargo hay una parte de su estructura que sobre sale de la cavidad, y por tanto, la hélice

12 no puede replegarse en su posición habitual, bloqueando el lugar de unión al coactivador (Figura 17), y previniendo la unión del estrógeno al receptor e inhibiendo su acción.

Se administra vía oral puesto que su elevada hidrofobicidad no permite su aplicación intravenosa, se absorbe rápidamente y alcanza concentraciones séricas máximas a las 4 a 7 horas. Las concentraciones en estado de equilibrio (alrededor de 300 ng/ml) se alcanzan después de administrar 40 mg al día durante 4 semanas. Posee una fuerte unión a albúmina sérica (>99%). El metabolismo es por hidroxilación, desmetilación y conjugación dando lugar a diferentes metabolitos, los cuales poseen perfil farmacológico similar al compuesto original contribuyendo al efecto terapéutico. La excreción tiene lugar principalmente por las heces con una vida media de eliminación de unos 7 días para el fármaco y de 14 días para el metabolito principal circulante N-desmetil-tamoxifeno. El tamoxifeno se metaboliza (Figura 18) principalmente por el CYP3A4 para dar el N-desmetil-tamoxifeno el cual a su vez puede ser metabolizado por el CYP2D6 para dar otro metabolito activo, endoxifeno, a través de 4-hidroxi-tamoxifeno (AEMPS, 04/2013).



**Figura 18:** Metabolización del tamoxifeno por los diferentes citocromos y sus correspondientes metabolitos con actividad farmacológica (Jordan, 2007)



## **OBJETIVO**



Actualmente para el tratamiento del cáncer existen varias líneas terapéuticas entre las que se encuentra la quimioterapia, pero los tumores tienen diversos mecanismos por los que se hacen resistentes a dicho tratamiento, es lo que se denomina “complejidad biológica”, y sobre todo se da en tumores sólidos. Uno de estos mecanismos son las proteínas de transporte de resistencia múltiple a fármacos (MDR), que bombean el fármaco fuera de la célula cancerígena, impidiendo su acción. Esto es una clara limitación en la efectividad de un tratamiento sistémico de los antitumorales. En general, los tratamientos quimioterápicos son administrados vía sistémica, lo que potencia la toxicidad que presentan los antineoplásicos y además provocan muchos efectos secundarios.

El diseño de nuevos sistemas poliméricos que puedan liberar de forma controlada y prolongada en el tiempo un determinado agente activo o fármaco, en un punto concreto del organismo es una de las estrategias que puede mejorar la efectividad de dichos fármacos.

Esta liberación sostenida permitiría administrar en una sola vez grandes cantidades de fármaco implantándolos en los tejidos próximos al tumor, de tal forma que así se disminuiría notablemente los efectos secundarios y su toxicidad sistémica.

El uso de biomateriales como son los polímeros, para recibir o encapsular el fármaco favorece la entrada del fármaco al interior celular por transportadores o endocitosis superando la resistencia que desarrollan estas células a estos tratamientos, ya que quedan en el interior sin ser expulsados fuera de la célula. Para que puedan tener una aplicación clínica en el organismo humano características como la biocompatibilidad, biodegradación y la velocidad de liberación han de ser los criterios más importantes a tener en cuenta en los soportes poliméricos que además, proporcionan una dispersión del fármaco uniforme y que al ser biodegradables no necesitan de cirugía posterior para ser eliminados.

Entre todas las formas de liberación, las nano/micropartículas presentan ciertas ventajas gracias a su tamaño reducido. Los tumores suelen desarrollar vasos tumorales anormalmente dilatados y perforados comparados con los vasos de los tejidos normales.

Estas partículas de tamaño submicrométrico podrían extravasarse por dichos vasos tumorales favoreciendo la liberación intracelular sostenida de los compuestos que llevan incorporados. Estas ventajas que presentan las micropartículas, frente al tratamiento convencional que se está llevando a cabo vía sistémica, hacen que se esté desarrollando

muchos estudios, y que sea el centro de la investigación para el tratamiento de muchos de los cánceres.

El fármaco de elección para la terapia endocrina en cánceres que responden a hormonas y en concreto cánceres de mama hormona dependientes son los moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERMs) cuyo máximo representante es el tamoxifeno. Teniendo en cuenta que su única vía de administración en la actualidad es vía oral, puesto que la vía intravenosa está impedida debido a su hidrofobicidad, al administrarlo a través de estos nuevos sistemas su eficacia se vería aumentada considerablemente mientras que sus efectos adversos disminuirían, a lo que se añade la facilidad de la administración y la fiabilidad, disminuyendo los errores debidos a olvido de toma o el incumplimiento terapéutico.

Teniendo en cuenta las consideraciones previas, **el objetivo principal** de este trabajo ha sido: *“El diseño, síntesis y caracterización de sistemas poliméricos micro/nanoparticulados para la mejora del tratamiento del cáncer de mama con tamoxifeno”*.

Para conseguir alcanzar este objetivo principal se han planteado los siguientes **objetivos secundarios y consecutivos**:

- Diseñar, sintetizar y caracterizar micro/nanosistemas basados en mezclas copoliméricas de poli Lactico-co-Glicolico que permitan modular la incorporación y liberación de tamoxifeno.
- Diseñar, sintetizar y caracterizar sistemas poliméricos inteligentes sensibles a cambios de pH y temperatura que permitan modular la incorporación y liberación de tamoxifeno con una mayor especificidad al medio.
- Funcionalización de los sistemas nanoparticulados con ácido fólico para conseguir una vectorización hacia células tumorales que sobreexpresan el receptor de folato.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

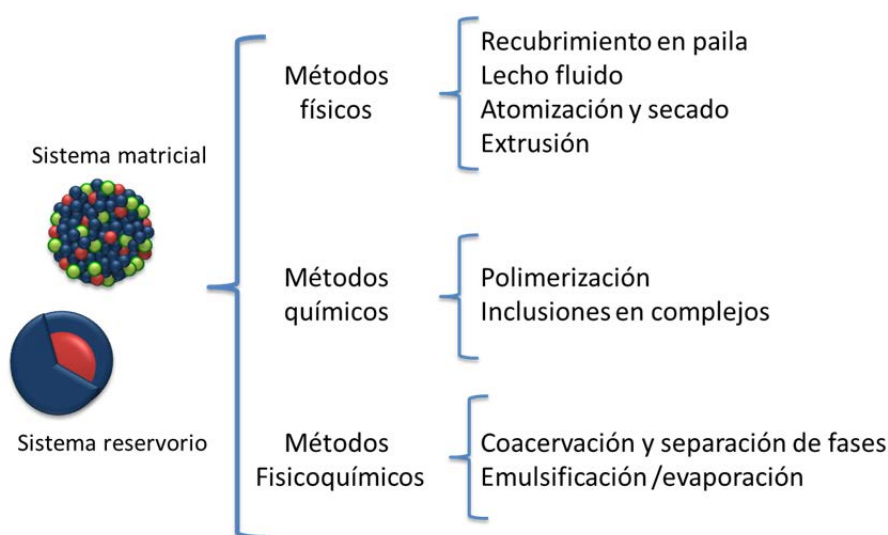




## 1.- DISEÑO Y MÉTODOS DE SÍNTESIS

Los sistemas de liberación controlada que a continuación se va a proceder a describir se han diseñado persiguiendo siempre la finalidad de conferir al sistema las mejores características químico físicas como son el tamaño, biocompatibilidad, biodegradabilidad, elevada eficiencia de incorporación del fármaco, proporcionar una buena estabilidad, protección del fármaco y producir una liberación controlada en el lugar de acción.

Estos sistemas de liberación controlada pueden sintetizarse por diversos métodos (Figura 19), ampliamente descritos en la literatura, en función de la finalidad perseguida, de las características y propiedades mecánicas, físicas y químicas del fármaco a encapsular y de los polímeros seleccionados.



**Figura 19:** Métodos de síntesis de los sistemas poliméricos

### A. SÍNTESIS DE MICRO/NANOPARTÍCULAS BASADAS EN POLIÉSTERES ALIFÁTICOS

#### A.1.- SÍNTESIS DE MICROESFERAS POR ATOMIZACIÓN Y SECADO (SPRAY DRYING).

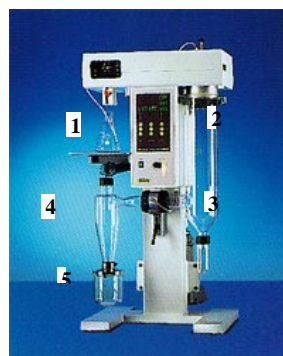
Comparando los métodos de síntesis de partículas, la atomización y secado, es el más simple, rápido y reproducible de todos ellos (Master, 1991). La técnica de atomización y secado "spray drying" se basa en la atomización de la sustancia activa, previamente dispersa o disuelta en la solución polimérica (material de recubrimiento). Las partículas se producen en el seno de la corriente de aire caliente. El disolvente se evapora rápidamente debido a las altas

temperaturas de esta corriente de aire, formándose instantáneamente las micropartículas. El dispositivo empleado a tal fin convierte en un solo paso una disolución o suspensión o emulsión en un polvo sólido, mediante un proceso que puede resumirse en cuatro etapas fundamentales (Giunchedi & Conte, 1995):

- 1.- Atomización
- 2.- Contacto con el aire caliente
- 3.- Secado de las gotas atomizadas
- 4.- Recogida del producto sólido obtenido

Este método de atomización y secado “Spray drying” fue el elegido para sintetizar micropartículas basadas en poliésteres alifáticos. Se llevó a cabo gracias al modelo Mini Spray Dryed B-191 de la casa Büchi en el que podemos diferenciar los siguientes apartados (*Figura 20*):

- Sistema de alimentación (1)
- Boquilla atomizadora (2)
- Cámara de secado (3)
- Cámara de separación (4)
- Cámara de recogida de las nano/micropartículas (5)



**Figura 20:** Mini Spray Dryed B-191 Büchi.

La atomización y secado tiene varios parámetros determinantes en la síntesis de las partículas que hay que optimizar en función del producto que se desee obtener y los materiales de partida que se vayan a utilizar. Estos parámetros, que previamente fueron optimizados son: temperatura de entrada (60°C), aspirador 70%, bomba (16%), flujo de aire (700 NI/h), concentración de la disolución (2% p/v) y el volumen de la disolución (50 – 100 ml).

### **PROCEDIMIENTO:**

Para conseguir la síntesis de micropartículas poliméricas mediante la técnica de atomización y secado se seleccionaron los siguientes polímeros:

- Poli (D, L-Láctico-co-glicólico) (PLGA), láctico: glicólico 50:50 → (PLGA 50/50) (Mw: 34400)
- Poli (D, L-Láctico-co-glicólico) (PLGA), láctico: glicólico 75:25 → (PLGA 75/25) (Mw: 57600)
- Poli ácido (D, L-láctico) → (PLA) (Mw: 40400)

Polímeros biodegradables basados en Poli (D,L-láctico) (PLA) y sus copolímeros con glicólico, Poli (D,L-láctico-co-glicólico) (PLGA), son propicios para ser utilizados por la técnica de atomización y secado con el Mini Spray Dryer B-191 y son los más usados en los sistemas de liberación controlada (Arpagaus & Schafroth, 2007)

El disolvente utilizado para todas las síntesis fue el diclorometano (DCM) ya que presenta un bajo punto de evaporación (39,8°C) adecuado para las condiciones establecidas. Tanto los polímeros como el fármaco empleado (tamoxifeno) presentan buenas propiedades de solubilidad en él, lo que hace posible tener en disolución todos los componentes de las micropartículas haciendo que la síntesis tenga un mayor rendimiento que en el caso de dispersiones o emulsiones.

Se realizó 10 síntesis distintas con y sin tamoxifeno y con distintas mezclas de polímeros, como se indica en la *Tabla 2*. Cinco de ellas incorporaron fármaco y las otras cinco fueron las correspondientes partículas sin fármaco. En el *Anexo I* se puede ver la nomenclatura de estos sistemas en función de su composición.

**Tabla 2:** Composición polimérica y nomenclatura de las síntesis de las distintas micropartículas por la técnica de atomización y secado.

SÍNTESIS	COMPOSICIÓN POLIMÉRICA	FÁRMACO INCLUIDO	NOMENCLATURA
1ª	PLGA 75/25	Tamoxifeno	S-LG75-TMX
2ª	PLGA 75/25	No	S-LG75
3ª	PLGA 50/50	Tamoxifeno	S-LG50-TMX
4ª	PLGA 50/50	No	S-LG50
5ª	PLGA 50/50 (50%) + PLGA 75/25 (50%)	Tamoxifeno	S-LG50:LG75-TMX
6ª	PLGA 50/50 (50%) + PLGA 75/25 (50%)	No	S-LG50:LG75
7ª	PLA (25%) + PLGA 50/50 (75%)	Tamoxifeno	S-LG50:L-TMX
8ª	PLA (25%) + PLGA 50/50 (75%)	No	S-LG50:L
9ª	PLA (25%) + PLGA 75/25 (75%)	Tamoxifeno	S-LG75:L-TMX
10ª	PLA (25%) + PLGA 75/25 (75%)	No	S-LG75:L

Una vez realizadas las síntesis, las partículas obtenidas se almacenaron en condiciones controladas de humedad, temperatura y protegidas de la luz para asegurar la estabilidad del fármaco y de los sistemas.

Todas las condiciones establecidas y obtenidas para el proceso de síntesis de cada una de las partículas quedan resumidas en la siguiente tabla (*Tabla 3*).

**a) SÍNTESIS DE MICROESFERAS SIN FÁRMACO (MS BLANCO)**

Las disoluciones iniciales fueron preparadas al 2% p/v de los polímeros en un volumen de 50 ml de disolvente (DCM) y se optimizaron las condiciones del método en función de los polímeros y disolvente utilizados (*Tabla 3*). En este caso no se incorporó fármaco por ser las “partículas control”.

**b) SÍNTESIS DE MICROESFERAS CON FÁRMACO (TAMOXIFENO) (MS-TMX)**

Las disoluciones fueron preparadas al 2% p/v del cual, el 95% p/v lo compuso el polímero y el 5% p/v restante el fármaco. Con fin de favorecer la mezcla de los componentes, primero se disolvieron por separado en un volumen menor de DCM, una vez disueltos por separado se mezclan ambas disoluciones en un solo matraz obteniendo un volumen final de 100 ml de disolución. Se optimizaron las condiciones de preparación por atomización y secado en función de los polímeros, fármaco y disolvente utilizados (*Tabla 3*).

**Tabla 3:** Condiciones de síntesis por el método de atomización y secado.

	PLGA 75/25		PLGA 50/50		PLGA 75/25 + PLGA 50/50		PLA + PLGA 50/50		PLA + PLGA 75/25	
	Sin TMX	Con TMX	Sin TMX	Con TMX	Sin TMX	Con TMX	Sin TMX	Con TMX	Sin TMX	Con TMX
Tª entrada (60 °C)	52-60	58-61	57-61	59-61	54-61	52-61	59-60	59-61	52-60	58-60
Tª salida (°C)	34-37	40-42	34-36	40-42	33-36	35-40	36-37	36-38	34-36	36-39
Flujo (l/h)	700									
Aspirador	70									
Bomba (ml/min.)	16% (5 ml/min.)									

## A.2.- SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS POR EMULSIÓN/EVAPORACIÓN

Mediante este método se consiguió la síntesis de nanopartículas a través de la adición de una fase orgánica en una fase acuosa con un emulgente determinado en agitación constante, formando así una emulsión de fase externa acuosa (O/A). Las partículas se formaron mediante la evaporación de la fase orgánica (fase interna) y con la consecuente precipitación de las partículas en la fase acuosa. En la fase interna se disolvió los componentes poliméricos que forman la matriz del sistema junto con el fármaco mientras que, en la fase externa (acuosa), se disolvió el tensioactivo por presentar un valor elevado de HLB (*“hidrofilic/lipofilic balance”*).

Como fase orgánica se utilizó una mezcla de diclorometano/etanol/acetona en una proporción 25:12,5:62,5% y como emulgente se seleccionó el poli (vinil alcohol) (PVA) (MW 30.000 – 70.000). Previo a la síntesis final de los sistemas se realizó una optimización de la técnica, con el copolímero PLGA 50/50, sobre la concentración de emulgente y de fármaco más adecuados. Para ello se realizaron distintas síntesis previas variando el porcentaje de emulgente (PVA) en la fase acuosa (2%, 1% y 0,5%) y variando la proporción de fármaco en la fase orgánica (5, 10 y 20%) (*Tabla 4*) hasta conseguir el mayor rendimiento, el menor tamaño de partícula y la mayor eficiencia de incorporación del fármaco. Se observó que las partículas con las mejores características se obtuvieron con una concentración de PVA del 0,5% en la fase acuosa y la mejor eficacia de incorporación con 10% de TMX, por lo que fueron las condiciones seleccionadas para las síntesis posteriores.

**Tabla 4:** Parámetros optimizados en la síntesis de nanopartículas por emulsión/evaporación.

COMPOSICIÓN POLIMÉRICA	FASE ACUOSA (% PVA)	FÁRMACO (% TMX)
PLGA 50/50	0,5	-
PLGA 50/50	1	-
PLGA 50/50	2	-
PLGA 50/50	0,5	5
PLGA 50/50	0,5	10
PLGA 50/50	0,5	20

Una vez establecidas las condiciones más óptimas de producción (0,5% de PVA y 10% de TMX), se procedió a realizar la síntesis de las partículas (con y sin fármaco) variando la

composición polimérica. Por último se procedió a realizar las mismas síntesis pero funcionalizadas con una molécula vectora (ácido fólico).

#### **A.2.1.- SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS SIN VECTORIZAR**

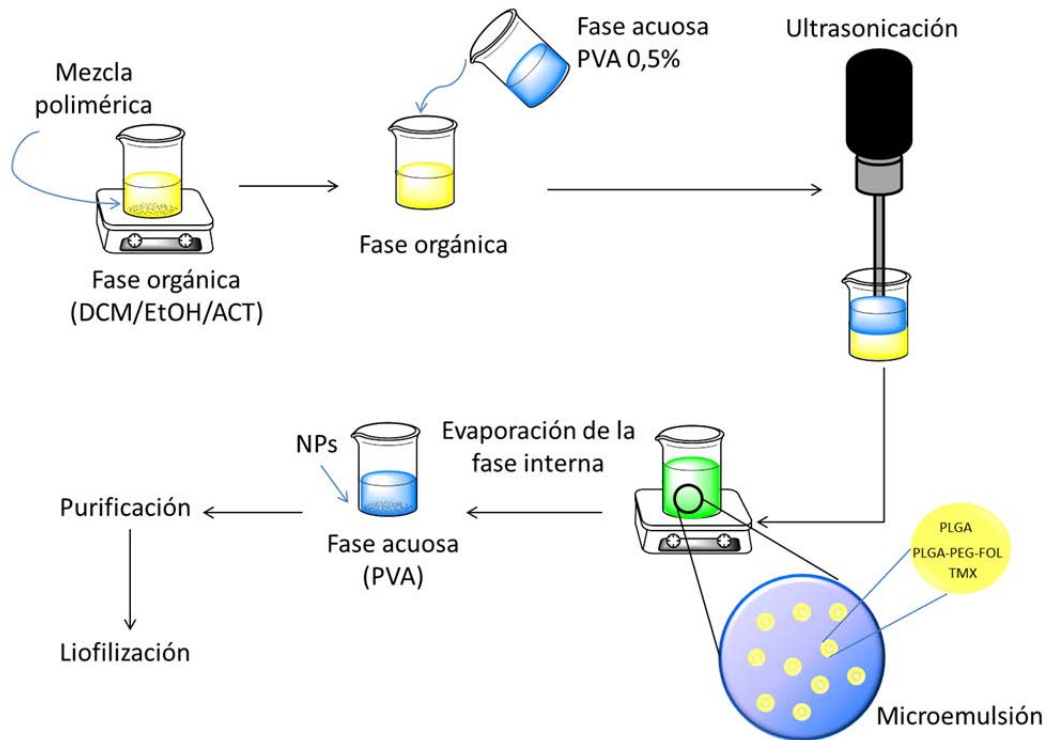
Una vez fijadas las condiciones más óptimas se realizaron 6 síntesis distintas variando la composición copolimérica, en tres de las cuales, se incorporó el fármaco durante el proceso en la fase orgánica mientras que en las otras tres se sintetizaron sin fármaco. El método de síntesis se basó en el desarrollado previamente por Esmaili y colaboradores (Esmaili et al., 2007) (Esmaili, Atiyabi, & Dinarvand, 2007) con algunas modificaciones.

##### **a) NANOPARTÍCULAS SIN FÁRMACO (NP BLANCO):**

100 mg de polímero o mezcla polimérica (*Tabla 5*) se disolvieron en 20 ml de fase orgánica, DCM/EtOH/ACT (25:12,5:62,5%) mediante agitación magnética. Posteriormente se añadió 50 ml de fase acuosa (solución acuosa de 0,5% PVA). Se sónico al 20% de potencia con pulsos de 5 segundos durante tres minutos con un ultrasonificador (Sonoplus Bandelin) para formar la microemulsión. A continuación se dejó en agitación magnética vigorosa durante 5 horas a 30°C para facilitar la evaporación de la fase interna orgánica. Las partículas precipitadas en la fase acuosa fueron recogidas mediante ultracentrifugación (Beckman Coulter optima™ L-100 XP) a 35.000 rpm durante 20 minutos. La purificación de estas nanopartículas se llevó a cabo con sucesivos lavados con agua milli-Q y posterior ultracentrifugación eliminando así cualquier resto de emulgente. Finalmente las partículas secas se obtuvieron a través de una liofilización final mediante un liofilizador Heto PowerDry LL11500 a -110°C durante 24 horas. Se conservaron en un ambiente seco a temperatura ambiente hasta su utilización (*Figura 21*).

##### **b) NANOPARTÍCULAS CARGADAS CON TAMOXIFENO (NP-TMX)**

Para la obtención de nanopartículas cargadas con tamoxifeno se siguió en mismo procedimiento anteriormente descrito incorporando el 10% de TMX en la disolución orgánica inicial y 90% de la mezcla polimérica.



**Figura 21:** Esquema de la síntesis de nanopartículas por emulsión/evaporación

**Tabla 5:** Síntesis nanopartículas sin vectorizar

COMPOSICIÓN POLIMÉRICA	FASE ORGÁNICA	FASE ACUOSA	FÁRMACO (TMX)
PLGA 50/50	DCM/EtOH/ACT	0,5% PVA	-
PLGA 50/50 + PLGA 75/25 (50%)	DCM/EtOH/ACT	0,5% PVA	-
PLA (25%) + PLGA 75/25 (75%)	DCM/EtOH/ACT	0,5% PVA	-
PLGA 50/50	DCM/EtOH/ACT	0,5% PVA	10%
PLGA 50/50 + PLGA 75/25 (50%)	DCM/EtOH/ACT	0,5% PVA	10%
PLA (25%) + PLGA 75/25 (75%)	DCM/EtOH/ACT	0,5% PVA	10%

PVA: poli vinil alcohol (emulgente); TMX: tamoxifeno (fármaco); PLGA: poli (Láctico-co-Glicólico); PLA: poli Láctico, DCM: diclorometano; EtOH: etanol; ACT: acetona.



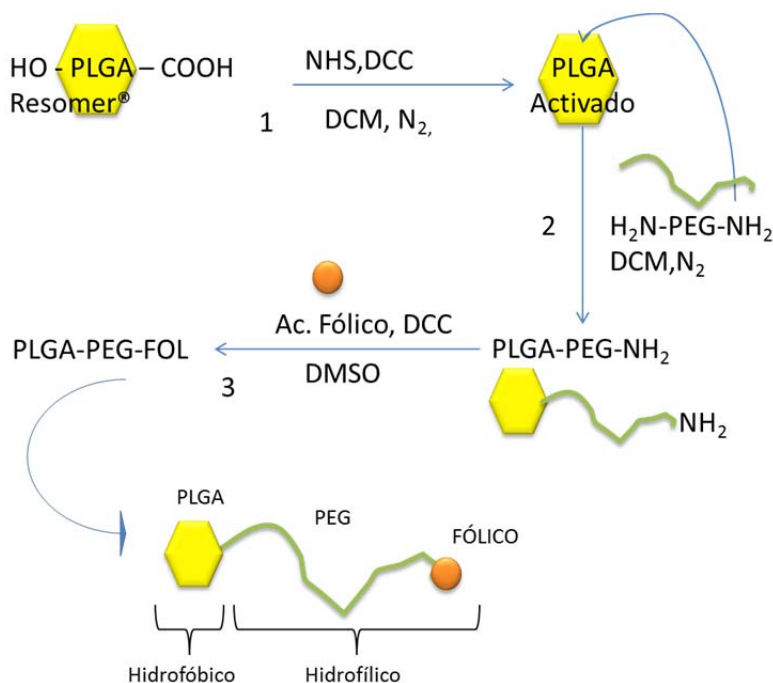
### A.2.2.- NANOPARTÍCULAS VECTORIZADAS CON FÓLICO

Las nanopartículas vectorizadas fueron obtenidas por la técnica de emulsión/evaporación siguiendo el mismo protocolo anteriormente descrito. En este caso se simplemente seleccionó un copolímero que contenía la molécula vectora en su estructura. Para conseguir la vectorización con ácido fólico se procedió a unir dicha molécula a uno de los polímeros que formarán parte de la estructura polimérica de la matriz del sistema. Se diseñó un copolímero formado por: PLGA 50/50 Resomer® RG 502H ácido terminal (Mw: 24000-37000), el poli (etilenglicol) bisamina (PEG) (Mw: 5000), y el ácido fólico (FOL) para formar el copolímero que pasaremos a nombrar PLGA-PEG-FOL.

Este copolímero no se encuentra comercializado por lo que se procedió a su síntesis mediante reacciones químicas del tipo de sustitución nucleofílica basados en los realizados por (Esmaili et al., 2008) (protocolo modificado de (Yoo & Park, 2004)).

- **Síntesis del copolímero PLGA-PEG-FOL:**

Esta síntesis se llevó a cabo en tres pasos (*Figura 22*):



**Figura 22:** Esquema de la síntesis del copolímero funcionalizado PLGA-PEG-FOL. 1) Activación de los grupos carboxílicos del PLGA; 2) Formación del PLGA-PEG; 3) Formación PLGA-PEG-FOL.

1.- ACTIVACIÓN DE LOS GRUPOS CARBOXÍLICOS DEL PLGA: el PLGA utilizado para la formación de este copolímero es un PLGA 50/50 carboxílico (RESOMER®). Presenta un grupo carboxílico terminal es lo que le permite, previa activación del mismo, formar una amida por el ataque nucleofílico de una amina.

PROTOCOLO: 2 g PLGA resomer® (Mw: 24000-37000), 164,35 mg de N-Hidroxisuccinimida (NHS) y 294,5 mg de N,N'-Diciclohexilcarbodiimida (DCC) se disolvieron en 20 ml de DCM. Dicha disolución se purgó con N<sub>2</sub> y se dejó reaccionar durante 24 horas para asegurar la completa activación de los grupos carboxílicos. Posteriormente se filtró para eliminar la diciclohexilurea formada como producto secundario de la reacción. La solución resultante se dejó gotear lentamente sobre dietil éter frío para precipitar el PLGA activado que se obtuvo después del secado a vacío de lo recogido en la torta del filtro.

2.- FORMACIÓN DEL PLGA-PEG: una vez activados los grupos carboxílicos del PLGA ya pueden ser atacados por una amina terminal procedente del PEG diamina (H<sub>2</sub>N-PEG-NH<sub>2</sub>).

PROTOCOLO: 1 g de PLGA activado se disolvió en 8 ml de DCM y se añadió poco a poco sobre una solución de 50 mg/ml de poli (etilenglicol) bisamina en DCM. De esta forma, el PEG bisamina, se encuentra en exceso con respecto al PLGA (en una proporción 1:5 PLGA:PEG) asegurando la total unión a los grupos carboxílicos del PLGA y la formación del PEG monosustituída dejando una amina terminal libre para la posterior unión al ácido fólico. Esta reacción se llevó a cabo en atmósfera inerte de N<sub>2</sub> durante 6 horas. La solución resultante fue precipitada en dietil éter frío, obteniendo el copolímero PLGA-PEG-NH<sub>2</sub> después de una filtración y eliminación total del dietil éter mediante su evaporación a vacío.

3.- FORMACIÓN PLGA-PEG-FOL: 200 mg del copolímero PLGA-PEG-NH<sub>2</sub> se disolvió en 5 ml de DMSO junto con 13 mg de ácido fólico y 13 mg de la carbodiimida (DCC). Esta solución se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 7 horas para favorecer la total reacción. Pasado este tiempo se añadió sobre 100 ml de metanol frío para precipitar el copolímero PLGA-PEG-FOL y mediante filtración se eliminó los productos secundarios de la reacción no precipitados. En metanol también pueden precipitar el copolímero PLGA-PEG y el fólico libre que no reaccionaron, por lo que se procedió a hacer una purificación. El precipitado obtenido

se disolvió en DCM (50 ml) pasando a la disolución el producto de la reacción, el copolímero PLGA-PEG-FOL, y precipitando el ácido fólico libre que mediante centrifugación (2900 rpm durante 20 minutos) se pudo eliminar. El sobrenadante (DCM) se añadió lentamente sobre dietil éter frío para precipitar el copolímero y se recuperó después de la filtración y secado a vacío. Toda esta última etapa se llevó a cabo en oscuridad debido a la fotosensibilidad que presenta el ácido fólico.

- **Síntesis de las nanopartículas vectorizadas con ácido fólico**

Una vez obtenido el copolímero con el ácido fólico unido, se procedió a la síntesis de las nanopartículas vectorizadas por la técnica de emulsión/evaporación siguiendo el mismo protocolo anteriormente descrito (*Figura 21*):

100 mg de polímero o mezcla polimérica (*Tabla 6*) fue disuelto en 20 ml de fase orgánica, DCM/EtOH/ACT (25:12,5:62,5%) mediante agitación magnética. Posteriormente se añadió 50 ml de fase acuosa (solución acuosa de 0,5% PVA). Se sonicó a 20% de potencia con pulsos de 5 segundos durante tres minutos con un ultrasonificador (Sonoplus Bandelin) para formar la microemulsión. A continuación se dejó en agitación magnética vigorosa durante 5 horas a 30°C para facilitar la evaporación de la fase interna orgánica. Las partículas precipitadas en la fase acuosa fueron recogidas mediante ultracentrifugación a 35.000 rpm durante 20 minutos. La purificación de estas nanopartículas se llevó a cabo con sucesivos lavados con agua milli-Q y posterior ultracentrifugación eliminando así cualquier resto de emulgente. Finalmente las partículas secas se obtuvieron a través de una liofilización final mediante un liofilizador a -110°C durante 24 horas. Se conservaron en un ambiente seco a temperatura ambiente hasta su utilización.

Para la obtención de nanopartículas cargadas con tamoxifeno se siguió en mismo procedimiento anteriormente descrito incorporando el 10% de TMX en disolución orgánica inicial y 90% de la mezcla polimérica.

**Tabla 6:** síntesis de nanopartículas vectorizadas con fólido

COMPOSICION POLIMÉRICA	FASE ORGÁNICA	FASE ACUOSA	FÁRMACO (TMX)
PLGA-PEG-FOL + PLGA 50/50 (50%)	DCM/EtOH/ACT	0,5% PVA	-
PLGA-PEG-FOL + PLGA 75/25 (50%)	DCM/EtOH/ACT	0,5% PVA	-
PLGA-PEG-FOL + PLA (50%)	DCM/EtOH/ACT	0,5% PVA	-
PLGA-PEG-FOL + PLGA 50/50 (50%)	DCM/EtOH/ACT	0,5% PVA	10%
PLGA-PEG-FOL + PLGA 75/25 (50%)	DCM/EtOH/ACT	0,5% PVA	10%
PLGA-PEG-FOL + PLA (50%)	DCM/EtOH/ACT	0,5% PVA	10%

PVA: poli vinil alcohol (emulgente); TMX: tamoxifeno (fármaco); PLGA: poli (Láctico-co-Glicólico); PLA: poli Láctico, DCM: diclorometano; EtOH: etanol; ACT: acetona.

En el Anexo I se puede ver la nomenclatura de estos sistemas en función de su composición.

## B.- SÍNTESIS DE NANOHIIDROGELES

Los nanohidrogeles son sistemas inteligentes capaces de ser sensibles a cambios externos y liberar el fármaco en determinadas condiciones ambientales. Estos se han diseñado con la finalidad de mejorar la liberación del fármaco e incrementar la especificidad de la terapia del tamoxifeno. Para conseguir a sensibilidad a determinados factores tumorales fue necesaria la síntesis de nuevos polímeros no comercializados y, al igual que las partículas anteriormente descritas, los nanogeles se sintetizaron sin funcionalizar y funcionalizados para mejorar la especificidad hacia la diana terapéutica hacia el tumor.

### B.1.- SÍNTESIS DE MONÓMEROS

- **Síntesis del monómero: 2-acril amido etil carbamato (2AAECM).**

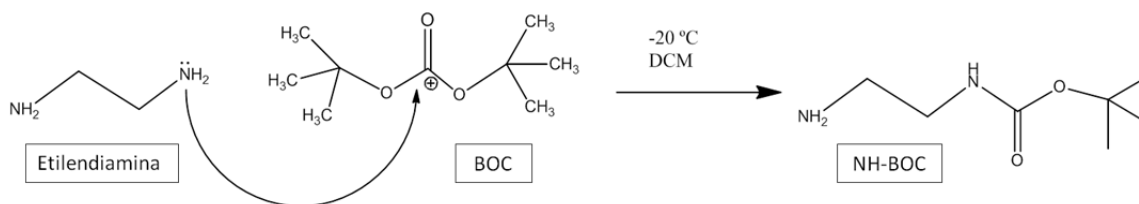
El monómero 2-acril amido etil carbamato, que pasamos a nombrar 2AAECM, es diseñado y sintetizado con la finalidad de unirse, mediante una reacción de post-síntesis de los nanohidrogeles, a la molécula vectora (ácido fólico). De este modo, el 2AAECM, va a formar parte del entramado polimérico del nanohidrogel quedando como un brazo extensor hacia el

exterior del sistema, facilitando la vectorización al disminuir el impedimento estérico con el resto del nanogel y el ácido fólico. Requiere la síntesis de un compuesto intermedio, N-tert-butoxicarbonil-etilen diamina (NH-BOC) (*Figura 23*), llevándose a cabo en dos etapas. Este producto intermedio va a presentar una amina terminal libre que es la responsable de la siguiente reacción para formar el monómero 2AAECM (*Figura 24*). La otra amina terminal de la molécula queda protegida con un grupo protector que será el que reaccionará con el ácido fólico posteriormente.

#### PROTOCOLO:

**SÍNTESIS DEL NH-BOC:** 18 g de BOC (Di-tert-butil dicarbonato) se disolvieron en 91 ml de DCM y se colocó dicha solución en un embudo de adición. Por otra parte, 20 g de etilendiamina se disolvieron en 180 ml de DCM y se colocó en el matraz de reacción (*Figura 25*). Se añadió lentamente la solución del BOC sobre la etilendiamina previamente enfriado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La temperatura de la reacción se controló con un termopar. Al final de la reacción la solución obtenida fue de color blanquecina y homogénea. Se deja atemperar el matraz de reacción a temperatura ambiente y en agitación magnética constante durante 16 horas. Después de este tiempo apareció un precipitado blanco. Se procedió a eliminar los restos de DCM mediante rotaevaporación quedando dicho precipitado blanco en donde se encuentra tanto el compuesto monosustituido como el bisustituido (subproductos de la reacción). Se aisló el compuesto monosustituido eliminando el disustituido mediante una purificación (*Figura 23*).

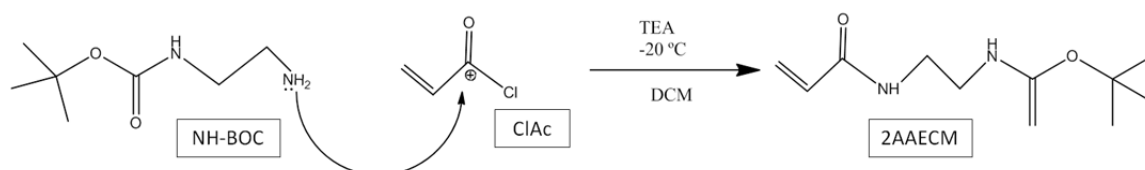
La purificación se lleva a cabo disolviendo el producto obtenido de la rotaevaporación en 90 ml de agua milli-Q en la que solo es soluble la forma monosustituida, lo que permitió eliminar la disustituida mediante filtración. A continuación se realizó la extracción orgánica del compuesto con acetato de etilo que se vio favorecida al añadir cloruro sódico. En total se realizaron 3 extracciones con 50 ml de acetato de etilo. Finalmente se obtuvo el monómero en estado sólido tras una rotaevaporación final eliminando cualquier residuo de acetato de etilo.



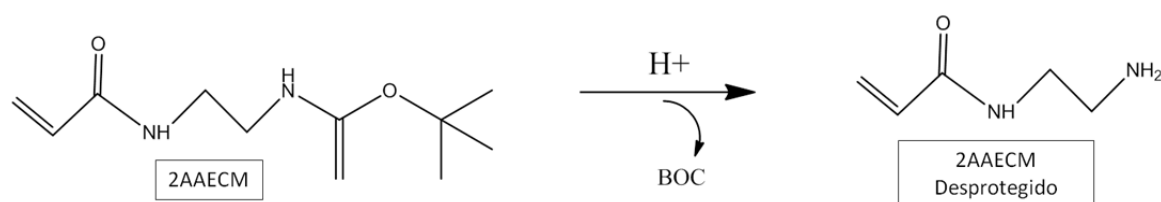
**Figura 23:** Reacción química de síntesis del NH-BOC (N-tert-butoxicarbonil-etilen diamina)

**SÍNTESIS DEL 2AAECM:** 7,21 g de NH-BOC se disolvieron en 30 ml de DCM con 6,27 ml de trietilamina (TEA) y se colocó en un embudo de adición. Independientemente, 4,54 ml de cloruro de acrililo (ClAc) se disolvió en 50 ml de DCM en un matraz de reacción de fondo redondo (Figura 25). Añadir lentamente y gota a gota el NH-BOC sobre el ClAc previamente enfriado a  $-20^{\circ}\text{C}$  con nitrógeno líquido en agitación constante. La variación de la temperatura durante la reacción se controló y monitorizó a través de un termopar. Al final de la reacción se observa que en el matraz de reacción la solución torna a un color blanco pobre con un precipitado en suspensión. Cuando haya terminado la total adición del NH-BOC se deja atemperar a temperatura ambiente. Se elimina el DCM por rotaevaporación obteniendo un precipitado blanco final. A continuación se procedió a realizar la purificación del monómero disolviendo el precipitado obtenido en 60 ml de agua milli-Q y realizar una extracción orgánica con 30 ml de acetato de etilo. Repetir dicha extracción sobre la misma fase acuosa hasta un total de 4 extracciones, recuperando la fase orgánica. Una vez recopilada todas las fases orgánicas de las extracciones se sometieron a rotaevaporación obteniéndose el 2AAECM en forma de un sólido blanco de gran volumen (Figura 24).

A



B



**Figura 24:** Reacción de síntesis del AAECM: A) Síntesis del 2AAECM a partir del NH-BOC;

B) Desprotección del 2AAECM

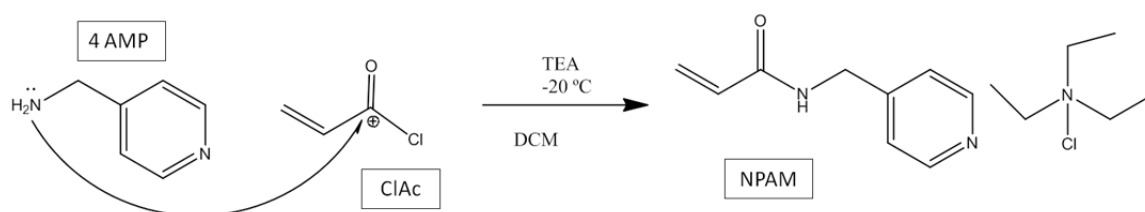


**Figura 25:** Esquema del equipo para la síntesis polimérica.

- **Síntesis del polímero N-piridin acrilamida (NPAM):**

N-piridin acrilamida es un polímero, el cual pasaremos a nombrar NPAM, que se ha diseñado con una amina en su estructura molecular susceptible de protonación a determinados pH. En este caso, la síntesis fue directa en un único paso sin intermedios de la reacción (*Figura 26*).

PROTOCOLO: 2,92 g de 4 amino metil piridina (4 AMP) fue disuelto en 30 ml de DCM con 3,76 ml de trietilamina (TEA) dicha disolución fue colocada en el embudo de adición. En el matraz de reacción se disolvió 2,19 ml de cloruro de acrililo (ClAc) en 50 ml de DCM (*Figura 26*). El ClAc se enfrió hasta  $-10^{\circ}\text{C}$  a cuya temperatura se empezó a añadir el 4 AMP. Cuando se ha conseguido el 100% de la adición se deja atemperar a temperatura ambiente durante dos horas, pasado este tiempo se elimina el DCM por decantación y los posibles restos se eliminaron por rotaevaporación. A continuación se procedió a la purificación del monómero. El soluto obtenido de la rotaevaporación se disolvió en agua milli-Q y se añadió sobre acetona para obtener mediante precipitación el monómero purificado.



**Figura 26:** Reacción química de síntesis del monómero NPAM

**B.2.- SÍNTESIS DE NANOHIIDROGELES NO VECTORIZADOS:**

Estos sistemas se han diseñado con unas características determinadas que van a incrementar la eficacia terapéutica del tratamiento. Se ha buscado la síntesis de sistemas sensibles a múltiples repuestas, lo que les proporciona una mayor especificidad terapéutica, liberando el fármaco solo cuando se encuentre en determinadas situaciones a las cuales es sensible. Por un lado se ha buscado que respondan a cambios de temperatura gracias al monómero N-isopropilacrilamida (NIPA) cuya temperatura crítica es de 32°C. Por otro lado van a responder a cambios de pH gracias al diseño y síntesis del monómero N-piridín acrilamida (NPAM) cuyo pH crítico es de 5. Por último serán susceptibles a ser vectorizados con ácido fólico gracias a la síntesis del monómero 2-acril amido etil carbamato (2AAECM). Considerando estas premisas se obtuvieron sistemas formados por NIPA-NPAM-2AAECM.

**PROTOCOLO DE SÍNTESIS:**

La síntesis de los nanohidrogeles NIPA-NPAM-2AAECM fue realizada por un proceso de polimerización directa en una microemulsión en la cual se empleó sesquioleato de sorbitán polietoxilado (ATLAS G-1086) como tensioactivo y el hexaoleato de sorbitán (ARLACEL 83) como co-tensioactivo. Una emulsión es un sistema termodinámicamente inestable en la que ambas fases no miscibles tienen a separarse continuamente. Para conseguir un sistema disperso estable es imprescindible tener un sistema emulgente específico que disminuya la tensión superficial entre ambas dos fases con un volumen determinado. La formulación de la microemulsión más estable fue aquella en la que el 58% del total del peso de la microemulsión está formada por la fase acuosa, el 17% la fase oleosa y el 25% por el sistema tensioactivo (Tabla 7).

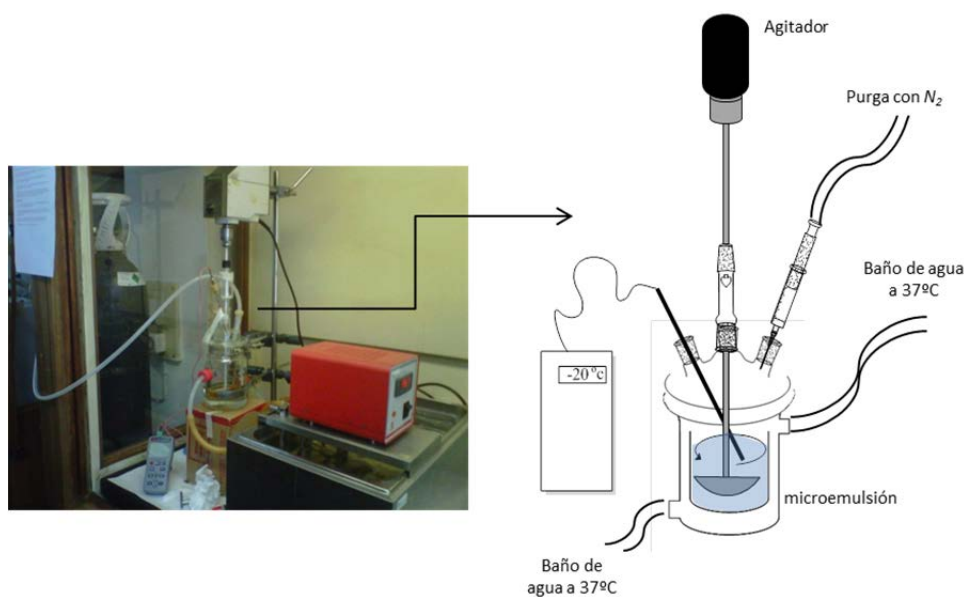
**Tabla 7:** Composición de la microemulsión

Fase Acuosa		Fase Oleosa	Sistema Tensioactivo	
58%		17%	25%	
Agua MilliQ	Monómeros	Isopar M	ATLAS G-1086	ARLACEL 83
80%	20%	100%	90%	10%



La mezcla de monómeros fue disuelta previamente en la fase acuosa a la que también se le añadió el entrecruzante, N,N-metilénbisacrilamida (NMBA), y la sal nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ ) la cual permite obtener un menor tamaño de gotícula interna. Esta mezcla acuosa se ultrasónico a una amplitud del 20% en pulsos de 5 segundos durante 3 min para asegurar la total disolución de todos los componentes en dicha fase. La fase oleosa se preparó de forma aislada a la acuosa. Esta segunda fase se formuló con isoparafina sintética hidrocarbonada (Isopar M) en la que se disolvieron y mezclaron los tensioactivos ATLAS G-1086 y ARLACEL 83 hasta tener una mezcla totalmente homogénea. Una vez preparadas las dos fases de forma independiente, la fase oleosa se añadió sobre la acuosa lentamente y en agitación vigorosa y constante para formar la microemulsión de forma espontánea a 25°C. Una vez formada la microemulsión se introdujo en un reactor mecánico (*Figura 27*), diseñado en nuestro propio laboratorio, equipado con un sistema de dosificación, agitación mecánica y un sistema de termostatzado gracias a una doble camisa del reactor. Una vez cerrado herméticamente el reactor con la microemulsión en su interior, se estableció una temperatura de 25°C en su interior mediante un el líquido calefactor/refrigerante a través de la doble camisa y se purgo el interior con  $\text{N}_2$  durante 20-30 minutos. Mediante un termopar introducido en el reactor y en la microemulsión se controló la variación de la temperatura durante todo el proceso.

La microemulsión permaneció en agitación mecánica contante (600 rpm) gracias al homogenizador electrónico Heidolph RZR 2050. Una vez conseguida una atmósfera inerte de  $\text{N}_2$  se añadió el iniciador, disulfuro sódico ( $\text{DSNa}$ ), en una concentración del 4% en función de la cantidad de monómeros totales. La polimerización tuvo lugar al instante viéndose reflejada con un aumento de la temperatura que quedó registrado por el termopar. Este aumento de temperatura se observa ya que es una reacción de polimerización de tipo radicalaria y exotérmica. Una vez finalizada la reacción la temperatura empieza a descender hasta alcanzar nuevamente la temperatura inicial de 25°C. En este momento se dejó reaccionar durante dos horas para asegurar el consumo del total del iniciador añadido y los monómeros. Se realizaron diferentes síntesis variando la composición monomérica para buscar la proporción más adecuada de los polímeros en el sistema y que, por lo tanto, este tenga el mejor comportamiento para la liberación controlada de TMX en las proximidades de un tumor (*Tabla 8*).



**Figura 27:** Reactor para la polimerización y síntesis de nanogeles

Posteriormente se procedió a la purificación de los nanohidrogeles mediante su precipitación en acetona y en dietil éter eliminando así cualquier resto de monómero que no haya reaccionado, iniciador o restos de tensioactivos. Los nanohidrogeles obtenidos se conservaron en un desecador hasta su posterior utilización.

**Tabla 8:** Composición monomérica en porcentaje (%) en la mezcla inicial de la polimerización de los nanohidrogeles sintetizados.

	MONÓMEROS			ENTRECRUZANTE	INICIADOR	SAL	Nomenclatura
	NIPA	NPAM	2AAECM	NMBA	DSNa	KNO <sub>3</sub>	
1	80	10	10	5	4	5	NG 80.10.10 5x
2	80	10	10	7	4	5	NG 80.10.10 7x
3	80	15	5	5	4	5	NG 80.15.5 5x
4	80	15	5	7	4	5	NG 80.15.5 7x
5	83	7	10	5	4	5	NG 83.7.10 5x
6	83	7	10	7	4	5	NG 83.7.10 7x

En el Anexo I se puede ver la nomenclatura de estos sistemas en función de su composición.

### **B.3.- SÍNTESIS DE NANOGELES VECTORIZADOS CON ÁCIDO FÓLICO:**

El ácido fólico es un ligando de fácil unión a una gran variedad de sustratos a través de sus grupos carboxílicos terminales; mediante la formación de un enlace tipo amida a través de una sustitución nucleofílica. Este procedimiento requiere la activación de los grupos carboxílicos previamente. Esta activación se realiza con una carbodiimida, EDAC (Hidrocloreuro de 1-(3- dimetilaminopropil-3-etilcarbodiimida)). Esta carbodiimida al ser hidrosoluble, así como la urea correspondiente (producto secundario de la reacción), facilitan su eliminación y purificación de los sistemas. La vectorización en este caso se realiza post-síntesis de los nanogeles. Una vez sintetizados los NG, se desprotege el monómero 2AAECM del grupo BOC (*Figura 24 B*) para, posteriormente, hacerla reaccionar con la molécula vectora a través de los grupos carboxílicos (previamente activados) (*Figura 28*).

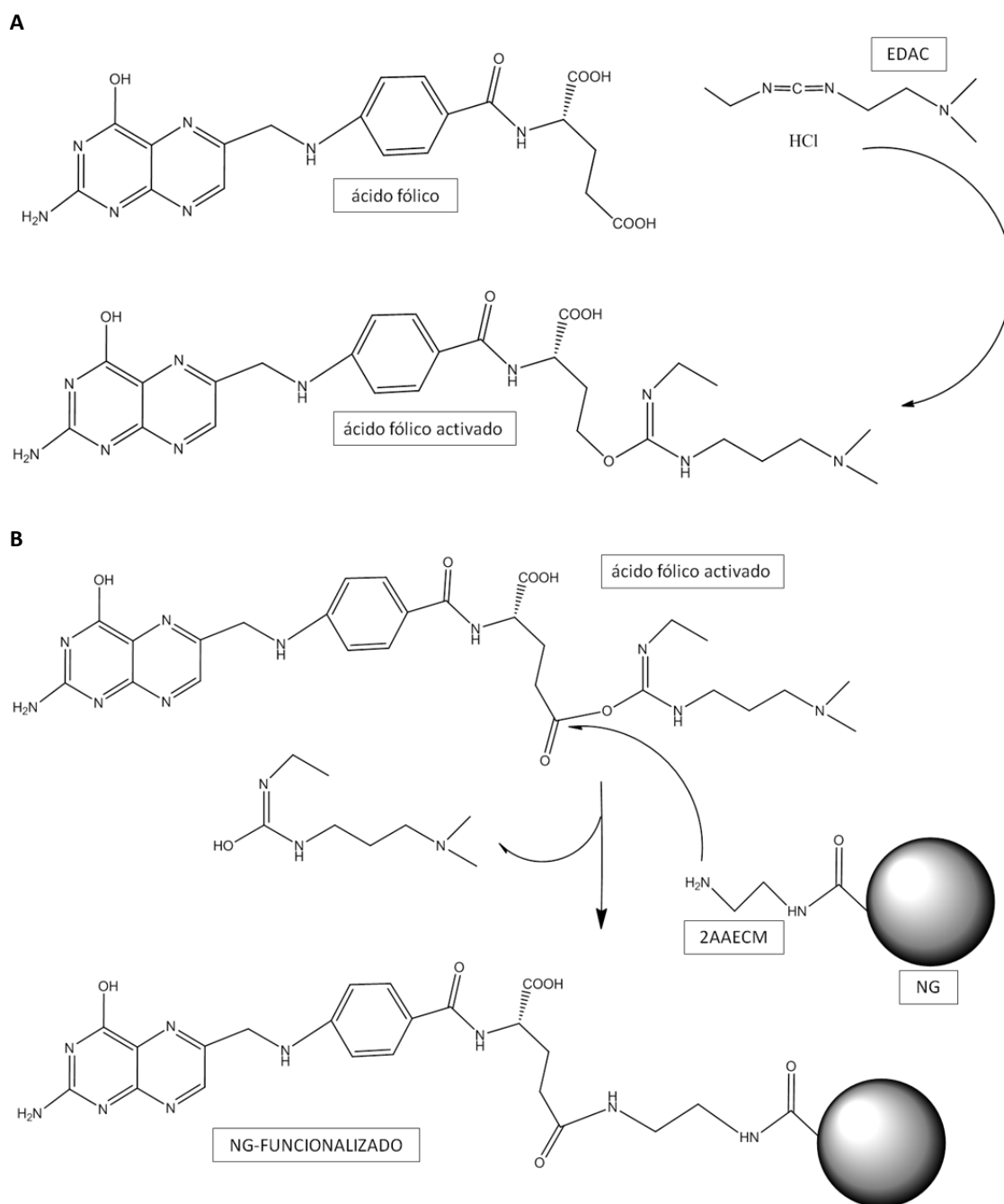
El procedimiento experimental utilizado para la obtención de los sistemas funcionalizados con fólico fue el siguiente.

#### **PROTOCOLO:**

1.- Desprotección de los NG: Cuando los NG se sintetizan, el monómero que se va a unir al fólico (2AAECM) se encuentra protegido por una molécula de BOC. Para conseguir su unión al fólico previamente ha de eliminarse dicho grupo protector dejando libre el grupo amina del 2AAECM, que es capaz de reaccionar con la molécula vectora formando una unión covalente. Esta desprotección se lleva a cabo en un medio ácido (*Figura 28 A*). Los NG se añadieron a un tampón ligeramente ácido (pH 5) y se dejaron en constante y vigorosa agitación durante 24 horas. Pasado este tiempo se purificaron mediante diálisis, para eliminar el BOC desprendido y las sales procedentes del tampón.

2.- Funcionalización con fólico: 178,7 mg de ácido fólico se disolvieron en 4,5 ml de agua mili-Q con 106,8 µl de trietilamina (TEA) y 155,11 mg de EDAC. Dicha disolución se dejó en agitación magnética durante 1h para asegurar la total activación de los grupos carboxílicos del ácido fólico. La carbodiimida solo va a activar uno de los dos grupos carboxílicos del ácido fólico puesto que el otro se encuentra muy cerca de los anillos produciendo un gran impedimento estérico en este punto. Como consecuencia de esta reacción se libera ácido clorhídrico al medio que es neutralizado con la trietilamina. Entre 0,5 y 0,6 g de nanogeles ya sintetizados y previamente desprotegidos se resuspendieron en 15 ml de agua milli-Q mediante agitación magnética durante 1h para favorecer el hinchamiento de la matriz

polimérica. Transcurrida la hora de activación del ácido fólico y resuspensión de los NG, se añadió la solución de fólico activado poco a poco sobre los nanogeles en constante agitación, y se dejaron reaccionar durante 20 horas en oscuridad (*Figura 28 B*). La purificación de los nanogeles funcionalizados se llevó a cabo mediante diálisis con agua milli-Q obteniéndose finalmente los nanogeles vectorizados mediante una liofilización final. Todo este proceso se realizó en condiciones de oscuridad debido a la fotosensibilidad del ácido fólico.



**Figura 28:** Reacción química de la funcionalización de los nanogeles. **A)** Activación del ácido fólico; **B)** unión de los nanogeles con ácido fólico previamente activado

#### **B.4.- INCORPORACIÓN DEL FÁRMACO EN LOS NANOGELES**

La incorporación del fármaco en el interior de un sistema particulado se puede realizar durante la síntesis, es decir, mientras se forman las partículas el fármaco queda encapsulado en su interior o bien se puede hacer post-síntesis, es decir, primero se elaboran las partículas y posteriormente se incorpora el fármaco (Vila Jato, 2009). La incorporación del fármaco en los nanogeles se realizó post síntesis.

En el caso de las micropartículas y nanopartículas la incorporación del fármaco se realizó durante la síntesis, mientras que, debido a las condiciones en las que se lleva a cabo la síntesis de los nanogeles, el fármaco se incorpora después. Los monómeros que van a formar parte del entramado del NG son hidrofílicos por lo que se disuelven en la fase acuosa, siendo ésta la fase interna dando microemulsiones de signo acuoso/oleosa (W/O). Sin embargo el fármaco presenta características hidrofóbicas quedando en la fase oleosa (fase externa), fuera de la formación de la partícula si se intentara incorporar durante la síntesis.

El tamoxifeno se incorporó en los nanogeles post-síntesis por hinchamiento en etanol absoluto donde el fármaco se encontraba previamente disuelto a una concentración de 5 mg/ml (solución stock) y los nanogeles se hinchan. La incorporación se llevó a cabo con 50 mg de NG y 500 µl de la solución stock de TMX en etanol con un posterior lavado mediante centrifugación. De esta forma el 100% de eficiencia de incorporación equivaldría a 50 µg TMX/mg de NG.

## **2.- CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS SISTEMAS**

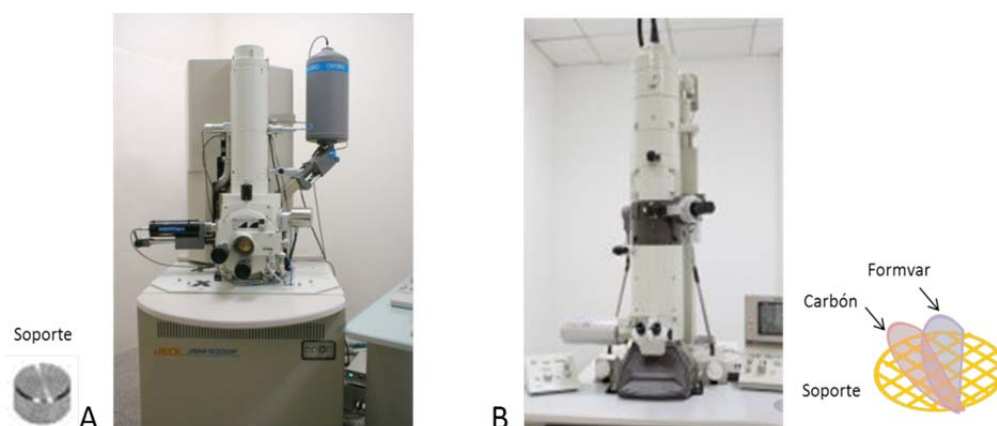
### **2.1.- ESTUDIOS MORFOLÓGICOS**

- **Microscopía Electrónica**: el estudio morfológico por microscopía electrónica se realizó en el ICTS Centro Nacional de Microscopía Electrónica de Universidad Complutense de Madrid. Se utilizó el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (Field-Emission Scanning electron microscope, FEG-SEM) Jeol JSM-6330F (*Figura 29*) para la caracterización de las micropartículas sintetizadas por atomización y secado y las nanopartículas sintetizadas por emulsión.

Este microscopio presenta una gran profundidad de campo, lo que permite analizar una gran parte de la muestra a la vez y produce imágenes de alta resolución obteniendo a una alta magnificación de las características de la superficie de la muestra. Por estas características, este microscopio electrónico, permitió la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, proporcionando información morfológica.

Esta técnica de microscopía requiere que todas las muestras hayan sido recubiertas con una capa fina de metal previamente. Las muestras se fijaron en un soporte rígido, se deshidrataron al vacío y se metalizaron con oro durante 3 minutos, con el metalizador EMITECH K550X.

Los nanogeles, al presentar unas características diferentes a los sistemas basados en poliésteres alifáticos, se estudiaron con un Microscopio Electrónico de Transmisión (Transmission Electron Microscopy, TEM) JEOL JEM 1010 (*Figura 29*). Este microscopio presentó un voltaje de aceleración de 100 KV con un cañón de electrones termoiónico de  $B_6La$ , una resolución entre puntos de 0,35 nm y con una cámara megaview II para captar las imágenes. Para poder observar las muestras en este microscopio se prepararon en un soporte de cobre con formvar y carbón de 200 mesh, adquiridos en TED PELLA, INC.



**Figura 29:** Representación de: A) un Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) y B) un Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM).

El tamaño de las partículas se ha obtenido midiendo el diámetro en las imágenes realizadas por el microscopio y calculando el diámetro promedio en número ( $D_n$ ), el promedio en peso ( $D_w$ ) y el índice de polidispersidad ( $U$ ) (*Ecuaciones 1*), el cual indica la distribución de tamaño de las partículas. Se ha medido una media de 900 partículas por cada muestra.

$$U = D_w / D_n$$

$$D_n = \sum N_i D_i / \sum N_i$$

$$D_w = \sum N_i D_i^4 / \sum N_i D_i^3 \quad (1)$$

**Ecuaciones 1:** *U* representa el índice de polidispersidad,  $D_n$  : diámetro promedio en número y el diámetro promedio en peso ( $D_w$ ).  $N_i$  es el número total de partículas y  $D_i$  el diámetro de todas las partículas.

El índice de polidispersidad (*U*) se define como el cociente entre el diámetro promedio en peso y el diámetro promedio en número. Siempre es mayor a la unidad y caracteriza la anchura de la distribución de los tamaños. Se considera que una distribución monodispersa viene determinada por un índice de polidispersidad de valor comprendido entre 1,0 y 1,1.

- **Difusión de la luz cuasielástica:** el *Dynamic light Scattering* (DLS) es el conjunto de técnicas más útil y versátil para la medida in situ de tamaños, distribuciones de tamaño y en algunos casos, formas de nanogeles en suspensión. La difusión de la luz dinámica (DLS) también se conoce como difusión de la luz cuasielástica (Quasielastic light scattering, QELS). Esta técnica permite estudiar la distribución de tamaños a partir de la intensidad de difusión de las partículas, usando la ecuación de Stokes-Einstein (Perez-Alvarez, Saez-Matinez, Hernaez, & Katime, 2008). Esta técnica se utilizó con un ángulo del 90°, un correlador Brookhaven BI-9000AT 522-channel digital equipado con una fuente de luz láser de Argón ajustado a 514,5 nm con refrigeración de agua. Las partículas se suspendieron en agua durante 24 horas. Las medidas se llevaron a cabo a 25°C obteniendo las distribuciones mediante un análisis CONTIN.

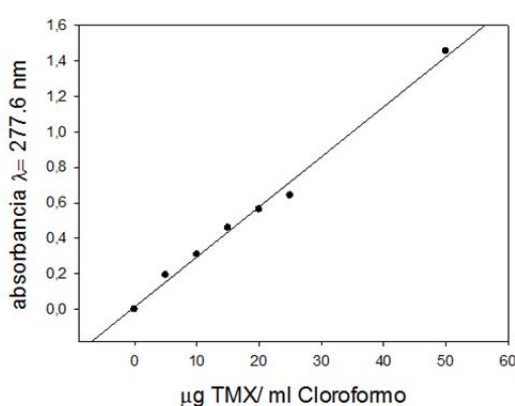
## 2.2.- **DETERMINACIÓN DE LA EFICACIA DE INCORPORACIÓN DEL TMX**

La eficiencia de incorporación indica la cantidad real de fármaco que los sistemas han incorporado con respecto a la cantidad de fármaco que se ha añadido en la síntesis inicialmente.

**Micropartículas basadas en poliésteres alifáticos sintetizadas por spray dryer:** Para cuantificar la cantidad de tamoxifeno en las partículas sintetizadas por atomización y secado, se pesó una cantidad de 3 mg de las micropartículas correspondientes y se le añadió 3 ml de

cloroformo (buen disolvente orgánico tanto para el polímero como para el tamoxifeno), agitando en el vortex, para obtener una disolución uniforme. Se midió directamente el tamoxifeno extraído, en la fase orgánica, por el método de espectrofotometría UV/visible a una longitud de onda de 277,6 nm (Fenandez et al., 2012), puesto que los polímeros no interfieren en la medida. Se utilizó un espectrofotómetro UNICAM serie 8700 y se midió en una microcubeta de cuarzo de 50  $\mu$ l y con 1 cm de paso. El estudio se realizó por triplicado.

Para la calibración se prepararon patrones de tamoxifeno en cloroformo con las siguientes concentraciones: 60, 50, 35, 20, 10, 5, 2,5  $\mu$ g/ml y 1  $\mu$ g/ml de las cuales se obtuvo una curva patrón (Figura 30).



**Figura 30:** Curva patrón con una de TMX en cloroformo.

Ecuación de la recta:  $Y = 0,013 + 0,028 X$  y un coeficiente de regresión:  $r^2 = 0,993$ .

**Nanopartículas basadas en poliésteres sintetizadas por emulsión:** una vez realizada la extracción del TMX, se cuantificó por el método del HPLC puesto que, en aquellos sistemas que estaban vectorizados con ácido fólico, éste podía interferir en la medida del espectrofotómetro. Para extraer el tamoxifeno de las nanopartículas se estableció el siguiente protocolo: a 3 mg de nanopartículas se añadió 200  $\mu$ l de diclorometano de tal forma que, después de cinco minutos de agitación magnética, las nanopartículas quedaron completamente disueltas, permaneciendo en disolución los polímeros y el tamoxifeno que contenían. A continuación se añadió 3 mililitros de metanol grado HPLC a la disolución y se dejó con agitación magnética durante 1 hora, tiempo suficiente para mezclar ambos disolventes. El tamoxifeno presenta buena solubilidad en ambos disolventes mientras que los polímeros solo se disuelven en diclorometano y no en metanol. El siguiente paso fue eliminar



el diclorometano por evaporación, puesto que el punto de evaporación es superior en el metanol (70°C) siendo de 32°C para el diclorometano. Las disoluciones se sometieron a evaporación a temperatura ambiente y agitación magnética durante una hora, considerando que durante el transcurso del cual se evaporó todo el diclorometano. Al permanecer solo el metanol como único disolvente, por centrifugación se consiguió separar el tamoxifeno (en el sobrenadante) quedando los polímeros en el precipitado. Una vez obtenido el tamoxifeno extraído se determinó su concentración por HPLC con detector de fluorescencia, previa derivatización a 254 nm para obtener el derivado fluorescente del tamoxifeno (ver apartado HPLC en materiales y métodos).

**Nanohidrogeles sintetizados por poimerización:** en este caso la extracción del fármaco se realizó de forma distinta por ser unos sistemas con características diferentes. Estos sistemas al estar entrecruzados no se pueden descomponer como lo hacen las partículas basadas en poliésteres alifáticos. El protocolo de extracción del TMX de estos NG fue el siguiente: 1 mg de los nanogeles correspondientes se pusieron en contacto con 14 ml de dimetil sulfóxido (DMSO) en constante agitación durante 24 horas. En este disolvente los NG experimentan un elevado hinchamiento incrementando su tamaño 4 veces en dimetil sulfóxido, 3,6 veces en dimetil formamida y 3 veces en metanol (Perez-Alvarez et al., 2009) facilitando la salida del fármaco. Esta extracción se ve además favorecida por la alta solubilidad del tamoxifeno en este disolvente orgánico (108 mg/ml) (Blanco et al., 2010). Transcurridos las 24 horas, los 14 ml de DMSO con los nanogeles se centrifugaron a 7000 rpm durante 5 min. para precipitar los nanogeles y del sobrenadante se recuperó, 1 ml en total, para cuantificar por HPLC.

### **2.3.- HPLC**

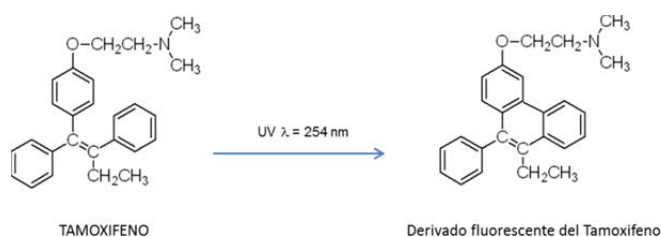
El HPLC son la siglas de *High Performance Liquid Chromatography* cuya traducción es “Cromatografía Líquida de Alta Eficacia” también denominada cromatografía de alta presión. Es un tipo de cromatografía en columna utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre la muestra a analizar y la columna cromatográfica. Esta técnica se empleó para confirmar los resultados de la eficiencia de incorporación del fármaco, así como la cantidad de tamoxifeno remanente en las partículas post-liberación y confirmar la no degradación del fármaco por las condiciones de síntesis.

La sustancia a analizar por esta técnica tiene que ser soluble en un medio que se considera la fase móvil, que, para el caso del tamoxifeno, se compone de 11% de trietilamina (TEA) (1% en agua a pH = 8) y 89% de metanol. La muestra es introducida en pequeñas cantidades y el equipo bombea a su vez la fase móvil a alta presión a través de la columna. Los compuestos o compuesto pasan por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria y van a interactuar con dicha fase, retrasándose diferencialmente según se avanza por la columna (dependiendo de las interacciones físicas o químicas). Por lo tanto el grado de retención va a depender de tres factores fundamentales: la naturaleza de la muestra, la composición de la fase estacionaria y la fase móvil. El tiempo de retención es el tiempo que tarda un compuesto en ser eluido de una determinada columna y es una característica propia de cada compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria.

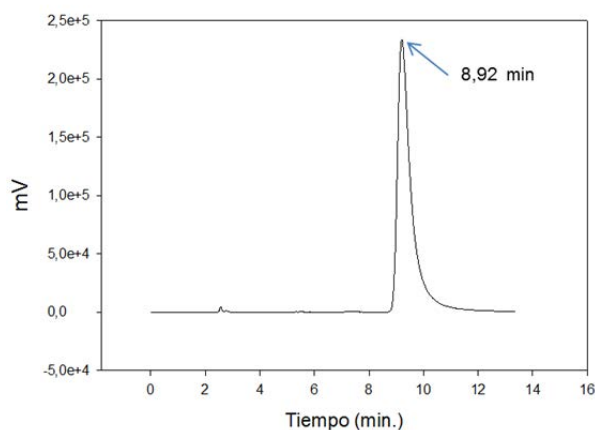
Se utilizó un equipo de Thermo Fisher constituido por un detector de fluorescencia (Spectra System FL300), una bomba HPLC (Spectra System P2000), un desgasificador (Spectra Systems SCM1000) y un reactor fotoquímico (formado por 5-m de serpentín y una lámpara ultravioleta AURA industries INC., New York, USA) acoplados a un ordenador con el software Chromquest<sup>TM</sup> 4.2 (Thermo). Las condiciones de elución del tamoxifeno en este equipo fueron las siguientes:

- 1.- La fase estacionaria fue una columna RP-Spherisorb ODS2, C<sub>18</sub>, 5µm (25 x 0,46 cm; Waters); la fase móvil fue trietilamina (1% en agua a pH 8) en metanol: 11/89 v/v y el flujo se estableció a 1 ml/min.
- 2.- En el detector de fluorescencia se seleccionó una longitud de onda de excitación ( $\lambda_{ex}$ ) y de emisión ( $\lambda_{em}$ ) de 250 nm y de 370 nm, respectivamente.
- 3.- El reactor fotoquímico utilizado tiene una longitud de onda de 254 nm y se situó entre la columna y el detector.

El tamoxifeno se derivatizó (*Figura 31*) para convertirlo en un producto derivado que presenta fluorescencia para detectarlo y cuantificarlo. El tiempo de retención del tamoxifeno a 27°C fue de  $8,92 \pm 0,12$  minutos, el cual se refleja en el cromatograma mediante un pico a dicho tiempo (*Figura 32*).

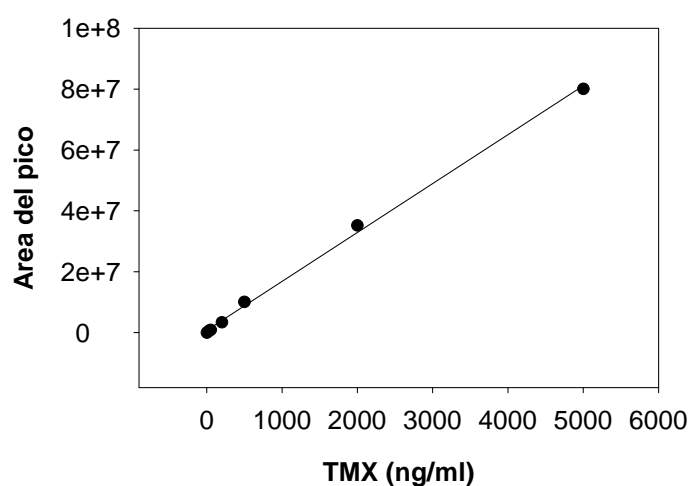


**Figura 31:** Derivatización del tamoxifeno cuando es excitado con una longitud de onda de 254 nm.



**Figura 32:** Cromatograma del tamoxifeno obtenido por HPLC en el que se observa el tiempo de retención.

La curva de calibración se realizó con estándares de tamoxifeno en metanol grado HPLC obteniendo una curva patrón (Figura 33) sobre la cual se interpolaron los valores obtenidos de la medida de las muestras utilizando el programa ChromQuest<sup>TM</sup>.



**Figura 33:** Curva patrón en HPLC de tamoxifeno en metanol HPLC.  
Ecuación de la recta: Área = 751878 + 16067,4 [TMX] ng/ml;  $r^2 = 0,998$

Para verificar la bondad de las medidas se determinó el coeficiente de variación (Shah et al., 1992) interdía e intradía para tres concentraciones de tamoxifeno (*Tabla 9*). En todos los casos fue inferior al 15% confirmandose la validez del método empleado.

**Tabla 9:** Coeficientes de variación (CV) interdía e intradía de las mediads de Tamoxifeno en el HPLC.

COEFICIENTE DE VARIACIÓN			
INTERDÍA		INTRADÍA	
[TMX] ng/ml	CV (%)	[TMX] ng/ml	CV (%)
25	5,1	15	4,1
500	3,3	500	2,3
5000	5,5	5000	0,5

#### 2.4.- ANÁLISIS TERMOGRAVIMETRÍCO (TGA)

Es una de las técnicas utilizadas dentro del campo del análisis térmico, el cual constituye un grupo de técnicas en las que una propiedad de la muestra es estudiada en función del tiempo o de la temperatura, mientras la temperatura de la muestra cambia en función de un programa establecido, en una atmósfera determinada. La termogravimetría es una técnica sencilla en la que la propiedad de la muestra estudiada es la variación de la masa (Soares, Santos, Chierice, & Cavaleiro, 2004).

Las curvas termogravimétricas (TGA) y sus derivadas (DTG) se obtuvieron mediante el analizador termogravimétrico TGA/SDTA851<sup>o</sup>, Mettler Toledo (*Figura 34*) usando crisoles de aluminio con 2 mg de producto a analizar bajo una atmósfera de nitrógeno dinámica (flujo de nitrógeno 6 cc/min.), a una velocidad de 10°C/min. en un intervalo de temperatura de 25°C a 600°C.



**Figura 34:** Equipo de termogravimetría TGA/SDTA851<sup>o</sup> y crisoles de aluminio con tapa

Se ha determinado la estabilidad térmica de todas las partículas sintetizadas con y sin fármaco incorporado, así como los componentes de síntesis por separado tamoxifeno, ácido fólico, polímeros y monómeros.

Esta técnica proporciona información cuantitativa y cualitativa de las características físicas y químicas del fármaco introducido en la partícula (Coughlan & Corrigan, 2006) (Horvat, Mestrovic, Danilovski, & Craig, 2005), así como de los polímeros y monómeros comercializados y los sintetizados en el laboratorio.

## **2.5.- ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)**

Esta técnica se basa en suministrar energía a través de una luz infrarroja a moléculas que son capaces de absorber dicha radiación IR pasando a un estado vibracional excitado, esta vibración molecular es detectada y representada en una serie de bandas formando un espectro infrarrojo. Hay dos tipos de vibraciones básicas: tensión (cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos) y flexión (cambios en el ángulo que forman dos enlaces). Cada molécula de un compuesto químico presenta un estado vibracional característico lo que permite identificar su localización en la estructura química.

Para la obtención de los espectros FTIR se utilizó un espectrofotómetro FTIR Nicolet modelo 6700 equipado con un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR) Smart Orbit. Se realizó un promedio de cien barridos con una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$

El procedimiento experimental se llevó a cabo siguiendo los pasos: se colocó unos 10 – 30 mg de muestra sobre el disco de diamante del accesorio Smart Orbit. Posteriormente se introdujo una punta de presión al accesorio ATR produciendo una presión hasta producir un buen contacto con la sustancia a analizar. Los espectros se obtuvieron gracias al software OMNIC instalado en un ordenador conectado con el FTIR.

## **2.6.- ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ( $^1\text{H}$ -RMN)**

Esta técnica se basa en núcleos atómicos magnéticamente activos con número impar de protones, que poseen espín (momento angular intrínseco), puesto que tienen carga positiva y un movimiento de rotación sobre un eje que hace que se comporten como pequeños

imanes. El núcleo más simple que se conoce es el átomo de hidrógeno que consta de un solo protón y tiene un espín de  $\frac{1}{2}$  (Guerrero Ramirez, 2009).

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$ -RMN) se obtuvieron gracias al espectrofotómetro Bruker Avance de 500 MHz conectado a un ordenador de control Silicon Graphics O2 en la modalidad de pulsos con transformada de Fourier.

El equipo consta de 4 partes:

- Un imán estable, con un controlador que produce un campo magnético preciso.
- Un transmisor de radiofrecuencias, capaz de emitir frecuencias precisas.
- Un detector para medir la absorción de energía de radiofrecuencia de la muestra.
- Un ordenador y un registro para realizar las gráficas del espectro de RMN.

Protocolo: una pequeña cantidad de muestra se disolvió en agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) y se introdujo en un tubo de RMN de vidrio fino que se introducirá en el campo magnético dentro del aparato. El campo magnético se mantiene constante mientras un breve impulso de radiación de radiofrecuencia excita a todos los núcleos simultáneamente. A medida que dichos núcleos vuelven a su posición inicial emiten una radiación de frecuencia igual a la diferencia de energía entre estados de espín. La intensidad de esta frecuencia disminuye con el tiempo a medida que todos los núcleos vuelven a su estado inicial. El ordenador recoge la intensidad respecto al tiempo y convierte dichos datos en intensidad respecto a la frecuencia obteniendo como resultado un espectro RMN. Los desplazamientos químicos se han medido en ppm.

## **2.7.- ENSAYO DE LIBERACIÓN**

Otra de las características relevantes estudiar en estos sistemas, es su capacidad para liberar el fármaco que en capsulan. Para este estudio se necesitaron matraces erlenmeyer de capacidad 50 ml con una cantidad fija de 30 mg de las nano/micropartículas que contenían tamoxifeno. Como medio de liberación se añadió 50 ml de PBS con 0,5% SDS (dodecil sulfato sódico) (previamente atemperado a  $37^\circ\text{C}$ ). Temperatura y pH se establecieron a valores similares a las condiciones fisiológicas obteniendo así información apropiada sobre la utilidad de estos sistemas en administración *in vivo* (Sastre et al., 2007). Este ensayo se llevó a cabo en

condiciones “sink” y el SDS se añadió para aumentar la solubilidad del fármaco en el medio de disolución y evitar que se adhiriera a las paredes, debido a su elevada hidrofobicidad.

El ensayo se realizó en un baño de agua Memmert con agitación horizontal, soporte y sistema de calentamiento, para el caso de las partículas sintetizadas por atomización y secado (spray dryer). Para las partículas sintetizadas por emulsión y los nanogeles se utilizó un agitador orbital (INFORS HT ecotron). A intervalos de tiempo, se extrajeron alícuotas de 100 µl de cada matraz y se reemplazaron con 100 µl de PBS + 0,5% SDS atemperado.

Las alícuotas se conservaron a -20°C hasta su cuantificación (previamente descongeladas y atemperadas a 37°C) por espectrofotometría UV-Visible, mediante el espectrofotómetro UNICAM serie 8700 a una longitud de onda de 277,6 nm, determinando así la concentración de tamoxifeno en el medio de liberación a distintos tiempos. Para el calibrado se utilizaron patrones de tamoxifeno de concentraciones variables entre 100 y 5 µg/ml en PBS + 0,5% SDS.

El ensayo de liberación se realizó por triplicado, por cada síntesis de nano/micropartículas y nanogel que contenían fármaco. Se tuvo en cuenta las condiciones “sink”, lo que significa que el volumen del medio es de 5 a 10 veces mayor que el volumen requerido para obtener una solución saturada de un fármaco o lo que es lo mismo la concentración del fármaco en el medio de disolución tiene que ser menor del 10% de la concentración de saturación. De este modo se asegura que la concentración del tamoxifeno en el medio de liberación sea lo suficientemente pequeño, como para conseguir la total liberación de dicha sustancia desde las partículas, sin que la disolución se sature, ni una elevada concentración afecte al proceso de liberación. Además la solubilidad del TMX en agua es muy baja (< 0,5 mg/ml a 37°C) (Guerrero Monjo, 2011) pero la presencia en el medio de liberación del tensioactivo SDS en muy baja proporción incrementa la solubilidad del TMX evitando que precipite en forma de cristales o se quede depositado en las paredes del recipiente de liberación.

## **2.8.- MODELOS MATEMÁTICOS**

Los modelos matemáticos pueden ser aplicados a la liberación de fármacos y pueden poseer la capacidad de demostrar matemáticamente cómo va a ser dicha liberación y los procesos por los cuales se ha llevado a cabo dicho proceso. Considerando los distintos tipos de administración, dosis de fármaco a incorporar y el perfil de liberación, las predicciones matemáticas nos permitirán una buena estimación de la composición requerida, geometría, dimensiones y proceso de preparación de las distintas formas de dosificación (Siepmann & Siepmann, 2008).

Hasta el día de hoy, numerosas teorías matemáticas han sido descritas en la literatura (Lin & Metters, 2006) (Arifin, Lee, & Wang, 2006) pero muchas de ellas carecen de exactitud y/o de aplicación. Una gran variedad de modelos han sido propuestos; desde empíricos y semi/empíricos hasta teorías basadas en procesos mecánicos reales. Por el contrario las teorías matemáticas “mecánicas” están basadas en fenómenos reales como difusión, hinchamiento, erosión, precipitación y/o degradación (Frenning, Brohede, & Stromme, 2005) (Raman, Berkland, Kim, & Pack, 2005). Este tipo de teorías permite la determinación de parámetros de los sistemas específicos que pueden explicar más profundamente los mecanismos de liberación de fármacos. Por ejemplo, la relativa importancia de muchos procesos que están involucrados en la liberación y pueden ser estimados (Ej.: la difusión del fármaco e hinchamiento del polímero). El desarrollo de los modelos matemáticos mecánicos reales y su aplicación permiten predecir cuantitativamente los efectos de formulación y procesar los parámetros como son los resultados de la cinética de liberación del fármaco.

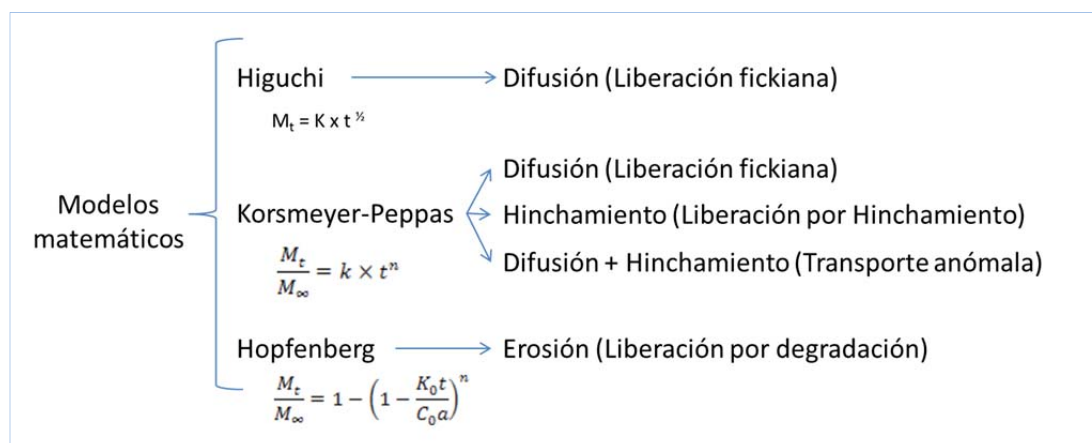
Cuando se usa o se desarrolla una teoría matemática para cuantificar la liberación de formas de dosificación farmacéuticas, hay una serie de factores a tener presente:

- La precisión generalmente aumenta con el aumento de la complejidad del modelo.
- Los cálculos teóricos deben ser comparados siempre con resultados experimentales.
- No hay una teoría matemática general que pueda ser aplicada a todos los tipo de sistema de liberación de fármacos.



### Modelos matemáticos empíricos y semi empíricos

Los modelos semiempíricos suelen ser bastante realistas en casos extremos, en los que se indica el mecanismo subyacente por el cual se libera el fármaco bajo condiciones específicas (Figura 35).



**Figura 35:** Modelos matemáticos semiempíricos que determinan el mecanismo de liberación del fármaco de un determinado sistema.

**2.8.1- HIGUCHI:** Higuchi publicó una famosa relación entre la raíz cuadrada del tiempo y la cantidad total liberada (Ecuación 2) desde una fina capa oleosa que contenía un exceso de fármaco basándose en las teorías de difusión (Higuchi, 1961). Este modelo matemático implica una serie de consideraciones:

- La concentración inicial en el sistema ha de ser superior a la solubilidad del fármaco.
- La geometría del sistema es una capa fina con dimensiones insignificantes en los bordes.
- El tamaño de las partículas es más pequeño que el grosor de la capa.
- El material del transportador no se disuelve ni se hincha.
- La difusión del fármaco es constante, no dependiente del tiempo ni posición.
- Se mantiene condiciones "sink" en todo el experimento.

$$\frac{M_t}{A} = \sqrt{D(2C_0 - C_s)C_s t} \quad (2)$$

**Ecuación 2:** Ecuación de Higuchi: donde  $M_t$  es la cantidad total acumulada de fármaco liberado a tiempo  $t$ ,  $A$  es el área superficial de la película expuesta,  $D$  representa la capacidad de difusión del fármaco por el material,  $C_0$  y  $C_s$  representan la concentración inicial de fármaco y la solubilidad del mismo en el transportador respectivamente.

Una forma simplificada de la ecuación está representada por la *Ecuación 3*:

$$M_t = K \times t^{1/2} \quad (3)$$

**Ecuación 3:** Ecuación de Higuchi simplificada, en la que  $M_t$  es la cantidad total acumulada de fármaco liberado,  $K$  es la constante de velocidad,  $t$  es el tiempo al cual se considera la cantidad liberada.

Es muy común emplear la ecuación en sistemas de liberación controlada que no cumplen todas las suposiciones anteriores, como es nuestro caso. En esta situación las posibles conclusiones han de ser tratadas con más cuidado. A pesar de esto, si la liberación se ajusta al modelo matemático no significa que necesariamente sea el único mecanismo subyacente por el cual se libera el fármaco.

**2.8.2.- KORSMEYER - PEPPAS** el uso de su ecuación (*Ecuación 4*) es muy frecuente y de aplicación sencilla, describe la liberación del fármaco (Peppas, 1985) a través de un mecanismo de difusión o hinchamiento.

Esta ecuación se aproxima a la de Higuchi. De tal forma que para que se dé una difusión fickiana en unas películas finas, el exponente de liberación de la ecuación equivale a 0,5, siempre y cuando todas las suposiciones de esa particular solución se cumplan, por ejemplo, la geometría de la película, los coeficientes de difusión (independientes del tiempo y la posición) en una matriz insoluble y no hinchable (condiciones del modelo de Higuchi). Sin embargo en esta ecuación se aplicó otras suposiciones, como distinta geometría de la partícula (cilindro y esfera) y distinto mecanismo de liberación de fármaco (hinchamiento).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \times t^n \quad (4)$$

**Ecuación 4:** Ecuación Korsmeyer-Peppas; donde  $M_t$  y  $M_\infty$  es la cantidad absoluta acumulada de fármaco liberado a tiempo  $t$  e infinito respectivamente,  $k$  es la constante que depende de las características geométricas del sistema y  $n$  es el exponente de liberación que indica el mecanismo por el cual se ha llevado a cabo la liberación.

Para otros sistemas geométricos teniendo en cuenta la difusión como el controlador del fármaco, se han determinado diferentes exponentes de liberación (*Tabla 10*): película fina  $n=0,5$ ; cilindro  $n=0,45$ ; esfera  $n=0,43$  (Ritger & Peppas, 1987a) (Ritger & Peppas, 1987b).

Por el contrario, si el hinchamiento del polímero es el único mecanismo que controla la liberación, los valores de “ $n$ ” varían. En una sistema de liberación con una geometría pelicular, se observa que la cinética de liberación es de orden cero, lo que corresponde con un exponente de liberación de  $n=1$ . Para otras geometrías distintas a la pelicular, se han evaluado diferentes valores de “ $n$ ” que pueden servir como indicadores del hinchamiento como mecanismo que controla la liberación. Los exponentes de liberación que se encuentran entre estos dos valores extremos (difusión fickiana e hinchamiento del polímeros) para cada sistema geométrico indicado, se denomina como transporte anómalo, así coinciden los diferentes tipos de fenómenos, incluyendo potencialmente la difusión del fármaco con el hinchamiento del polímero (*Tabla 10*).

**Tabla 10:** Mecanismo de liberación en función de la morfología de la partícula y el valor que adquiere el exponente de liberación “ $n$ ”.

Película fina	Cilindro	Esfera	Mecanismo
0,5	0,45	0,43	Difusión fickiana
$0,5 < n < 1,0$	$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	Transporte anómalo
1,0	0,89	0,85	Hinchamiento polímero

**2.8.3.- HOPFENBERG:** (Hopfenberg, 1976) propone un interesante modelo semi empírico que permite la descripción cuantitativa de la liberación del fármaco desde sistemas degradables, los cuales proporcionan una velocidad de liberación determinada (*Ecuación 5*). Dicha velocidad es proporcional al área superficial del sistema y dependiente del tiempo. El modelo de Hopfenberg puede ser aplicado a la erosión de la superficie de las matrices poliméricas, para lo

cual, la liberación del fármaco de la superficie sigue un proceso de orden cero y es el paso limitante de la velocidad de liberación.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left(1 - \frac{K_0 t}{C_0 a}\right)^n \quad (5)$$

**Ecuación 5:** Ecuación Hopfenberg; donde  $M_t$  y  $M_\infty$  concentración máxima de fármaco liberado hasta el tiempo  $t$  y tiempo infinito respectivamente;  $C_0$  denota la concentración inicial de fármaco y  $a$  es el radio del cilindro o esfera o de la parte más ancha (en el caso de tener una morfología amorfa),  $n$  es el factor de forma de las partículas siendo esférico cuando  $n=3$ , cilíndrica cuando  $n=2$ , geometría amorfa  $n=1$ . Este modelo ignora los efectos del borde.

Al aplicar dicha ecuación se consideró  $n = 3$  ya que, como muestran los estudios morfológicos (Figura 42, 43, 44, 45) los sistemas presentan una morfología esférica.

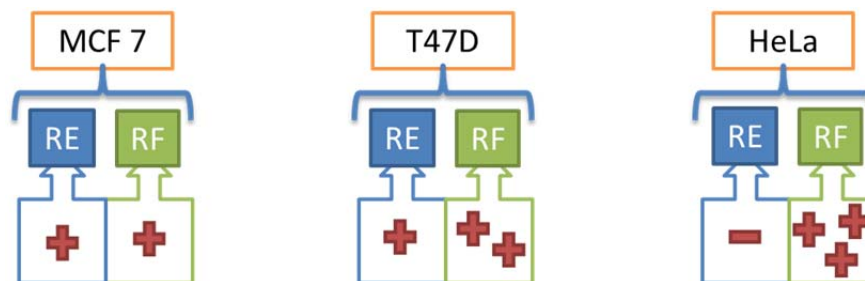
### 3.- ESTUDIOS EN CULTIVOS CELULARES

Estos estudios permiten dar un paso más en la caracterización de los sistemas de liberación controlada cuando su caracterización *in vitro* se ha completado. Se ha empleado cultivos 2D de células epiteliales, las cuales crecen en monocapa en la superficie del frasco donde se siembran. Son modelos celulares muy beneficiosas puesto que permiten la rápida determinación de la incorporación celular de los sistemas, la bioactividad del fármaco y la toxicidad del vehículo (Cho et al., 2013) (Hernandez-Vargas et al., 2007). Se han seleccionado tres líneas celulares diferentes (MCF7, HeLa y T47D) basándose en la expresión de receptores de estrógenos y receptores de folato (Figura 36), para poder evaluar la acción del fármaco antitumoral y la internalización de las partículas por la funcionalización con ácido fólico.

- **Células MCF7:** línea celular de carcinoma de mama humano (proporcionadas por el Dr. Cayetano Von Kebbe). Estas células se desarrollaron en 1973 a partir de un derrame pleural de carcinoma de mama humano. Han sido ampliamente utilizadas como modelo *in vitro* para evaluar la eficacia de antitumorales. Es una línea celular positiva para receptores de estrógenos (Walter et al., 1985) y receptores de folato (Martinez, Olmo, Iglesias, Teijon, & Blanco, 2014).

El mecanismo por el cual el TMX inhibe el crecimiento celular en esta línea es mayoritariamente por la inhibición de la unión del estrógeno a su receptor (Shang & Brown, 2002) (Miller & Katzenellenbogen, 1983) y la incorporación celular a través de un proceso no específico de endocitosis (Chawla & Amiji, 2002). También se ha observado que el TMX modula la proteína quinasa C a través de una vía oxidativa cuando las células de cáncer de mama son negativas para los receptores de estrógeno (Gundimeda, Chen, & Gopalakrishna, 1996) (Duh et al., 1997).

- **Células T47D:** Línea celular de carcinoma de mama humano (proporcionadas por el Dr. Pérez-Castillo). Presentan tanto receptores de fólculo como receptores de estrógeno positivo (Geszke et al., 2011) (Walter et al., 1985).
- **Células HeLa:** Línea celular de cáncer de cérvix (proporcionadas por el Dr. Alberto Tiérrez). Se obtuvieron de un adenocarcinoma cervical de una mujer en 1951 siendo una de las líneas celulares más antiguas (Jones, 1997). Es una línea celular negativa en la expresión de receptores de estrógenos y positiva en la expresión de receptores de folato (Geszke et al., 2011) (Walter et al., 1985). El tamoxifeno en este tipo celular se ha demostrado que actúa activando diferentes MAPKs (ERK2 y JUN1) (Duh et al., 1997).



**Figura 36:** Esquema de la expresión de los receptores de estrógeno (RE) y fólculo (RF) por parte de tres líneas celulares seleccionadas: MCF7, T47D, HeLa.

Toda la manipulación y experimental con células se ha llevado a cabo en un área independiente manteniendo las condiciones de esterilidad evitando la contaminación de los cultivos. Se ha trabajado en una campana de flujo laminar vertical (Heraeus-Hera Safe) y en cuanto al material de plástico, se ha obtenido estéril de la casa Sarstedt (Sarstedt Ag and Co.) y todo aquel material de vidrio y reutilizable se han esterilizado previamente en un autoclave (Steam Sterilizer TRADE Paypa) a 121°C durante 21 minutos.

### Mantenimiento del Cultivo

Las células fueron mantenidas en un medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) + GlutaMax-I (Gibco BRL) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor, penicilina (50 U/ml), estreptomicina (50 µg/ml) (Invitrogen Live Technologies) y gentamicina (50 µg/ml) (Sigma-Aldrich) en un incubador humidificado a 37°C y 5% de atmósfera de CO<sub>2</sub> (HERA cell, Sorvall Heraeus, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Germany). Las células fueron sembradas en frascos de 75 cm<sup>2</sup> (Sartedt Ag and Co., Barcelona, Spain). Los pases se realizaron cuando alcanzaban el 95% de confluencia mediante una tripsinización (0,05% tripsina/0,53 mM EDTA). La confluencia del cultivo se evaluó visualmente a través de un microscopio invertido de contraste de fases (Zeiss) y el estado del cultivo se controló también por la metabolización del medio de cultivo observando el color de un indicador de pH que contiene el medio (rojo fenol). Al ser un cultivo monocapa, cuando las células pueblan toda la superficie útil de frasco donde se encuentran tienen que agregarse y entran en fase de muerte celular y el crecimiento se ve inhibido por contacto, es por ello que se realiza el subcultivo cuando se encuentran en un 90% o 95% de confluencia.

### Subcultivo:

El cultivo celular se lava con tampón fosfato salino (PBS) (Sigma-Aldrich) autoclavado para eliminar bien todo el medio que puede neutralizar la acción de la tripsina. A continuación las células se separan gracias a una solución de tripsina (0,05%) (Invitrogen Live Technologies) durante 5 minutos en la incubadora a 37°C. Para evitar que las células estén sobre expuestas a la tripsina y que las pueda matar se neutraliza con medio de cultivo con suero fetal bovino. Esta suspensión celular se centrifuga a 1500 rpm - 5 min (Digiten 20-R centrifuge), de esta forma las células quedan en el pellet y se descarta el sobrenadante con la tripsina neutralizada y todas aquellas células muertas. Las células en el pellet se resuspenden y se licuan en nuevos frascos en las concentraciones necesarias para cada experimental o mantenimiento de la línea celular.

En los experimentos con células es importante partir siempre de la misma población o concentración de células. Este valor se obtiene de la cámara de Neubauer o hemocitómetro. Esta cámara nos permite hacer un recuento de las células que hay en una suspensión al colocar sobre ella una alícuota de 10 microlitros.

#### Conservación del cultivo celular:

Las líneas celulares se conservan y se mantienen en un congelador de -80°C y en nitrógeno líquido hasta su utilización. Las células se congelan de forma progresiva hasta alcanzar la temperatura para hacer el procedimiento menos agresivo para las células en tubos resistentes al DMSO de 2 ml estériles de polipropileno. Así mismo se añade 10% v/v de dimetil sulfóxido (DMSO) como crioprotector en el medio de congelación 90% v/v de FBS.

Cuando un cultivo celular se descongela para su utilización ha de ser un proceso rápido a 37°C transfiriéndolos a un tubo falcon con unos 10 ml de medio de cultivo para diluir el DMSO (tóxico para las células). Posteriormente las células se recogen por centrifugación eliminando el sobrenadante con el DMSO. Estas células ya se pueden sembrar en la concentración buscada en un nuevo frasco. Generalmente se procede a mantener el cultivo durante dos pases antes de cada experimental para dejar al cultivo que se estabilice.

Los estudios que se llevaron a cabo en estas líneas celulares fueron:

- Viabilidad celular en contacto con las partículas con fármaco (citocompatibilidad).
- Biocompatibilidad celular en contacto con las partículas sin fármaco.
- Incorporación celular en contacto con las partículas vectorizadas y sin vectorizar.

### **3.1.- VIABILIDAD CELULAR Y CITOCOMPATIBILIDAD**

Cuando los biomateriales se utilizan para formular sistemas de liberación controlada es crucial evaluar la citocompatibilidad para asegurar la seguridad del sistema y disminuir la toxicidad (Naahidi et al., 2013). La citocompatibilidad se puede medir de forma indirecta a través de la viabilidad celular después de la exposición celular al biomaterial durante un periodo de tiempo determinado. Esta viabilidad celular también proporciona información de la toxicidad del biomaterial o actividad farmacológica cuando las células están expuestas al fármaco.

La viabilidad celular fue evaluada indirectamente mediante el método colorimétrico de metiltiazoletetrazolium (MTT) basado en el descrito por Mosmann (Mosmann, 1983). Se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol por la

enzima mitocondrial, succinato deshidrogenasa, en un compuesto de color morado/azul (formazán), cuya absorbancia a 570 nm permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas y de forma indirecta permitirá conocer la proporción de células vivas. Inicialmente el compuesto es soluble en agua y por tanto en el medio de cultivo mientras que los cristales de formazán púrpuras lo son en un disolvente orgánico como es el DMSO dándole una coloración más o menos intensa en función de la cantidad de formazán, de manera que el valor resultante hace referencia al valor de células vivas (Xu, Ji, Chen, & Shen, 2005). La absorbancia se midió en un lector de placas (varioscan, Thermo Fisher Scientific). Las células no tratadas presentaron el 100% de viabilidad siendo la absorbancia de referencia para la medida en los pocillos con células tratadas.

Todas las condiciones experimentales se realizaron por quintuplicado y cada experimento por triplicado. Inicialmente se realizó un estudio para evaluar la concentración de TMX más adecuada para estas líneas celulares (desde 0,01  $\mu$ M hasta 1 mM). La concentración más óptima seleccionada para los siguientes estudios fue de 10, 30 y 50  $\mu$ M. Para el experimento las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una concentración de 5000 células/pocillo para las MCF7 y T47D, mientras que las HeLa se sembraron a 2500 células/pocillo debido a su elevada velocidad de crecimiento. 24 horas después de la siembra, el medio fue reemplazado por 100  $\mu$ l de medio al 1% FBS con las MS o NP o NG a estudiar con y sin TMX así como TMX en disolución a una concentración de 10 y 6  $\mu$ M. A distintos intervalos de tiempo (1, 3 y 6 días) se añadió a cada pocillo 10  $\mu$ l de una solución de MTT en DMEM 1% FBS (5 mg/ml). Después de 2 horas de incubación a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> a cada pocillo se añadió 100  $\mu$ l DMSO (Han et al., 2009). La viabilidad celular se determinó a través de la medida de la absorbancia a 570 nm con un espectrofotómetro (Varioskan, Thermo Fisher Scientific, Barcelona, Spain). Los resultados se representaron como el porcentaje de viabilidad celular en relación a la viabilidad de células control no tratadas.

### **3.2.- INCORPORACIÓN CELULAR DE LAS PARTICULAS (UPTAKE)**

Cuando las partículas llegan a su lugar de acción, en este caso un tumor, tienen que ser capaces de liberar el fármaco y producir una disminución de la viabilidad celular de las células tumorales. Esta liberación la pueden realizar en el exterior celular o si por el contrario son capaces de incorporarse intracelularmente lo pueden hacer en el interior celular, modificando así la efectividad de la terapia. El mecanismo por el cual se incorporan las partículas en las



células va a depender de sus características físico-químicas (Huang, Mocherla, Heslinga, Charoenphol, & Eniola-Adefeso, 2010).

Este estudio se llevó a cabo con el fin de cuantificar y evaluar la inclusión de los sistemas funcionalizados y sin funcionalizar en el interior celular. Se evaluó mediante la fluorescencia de un cromóforo (6-coumarina) incorporado en las partículas. Se sintetizaron nanopartículas por emulsión y nanogeles con la misma composición y bajo el mismo protocolo de síntesis previamente descrito pero con 6-coumarina en vez del TMX en las mismas concentraciones. La coumarina es 3-(2-Benzothiazolyl)-*N,N*-diethylumbelliferylamine, un colorante fluorescente. Entre una de sus aplicaciones está marcar los sistemas de liberación controlada para evaluar su comportamiento in vitro (Finke et al., 2014). Los marcadores fluorescentes son muy utilizados en los estudios de internalización celular de partículas poliméricas (Panyam, Sahoo, Prabha, Bargar, & Labhasetwar, 2003) (Pietzonka et al., 2002) y en concreto la coumarina (Martinez, Benito-Miguel, Iglesias, Teijon, & Blanco, 2012) (Martinez et al., 2014) (Perez et al., 2012).

Todas las condiciones experimentales se realizaron por quintuplicado y cada experimento por triplicado. Para este estudio se sembraron en placas de 96 pocillos a una concentración de 10000 células/pocillo para las MCF7 y T47D, mientras que las HeLa se sembraron a 5000 células/pocillo debido a su elevada velocidad de crecimiento. 24 horas después el medio fue reemplazado por 100 µl de medio al 1% FBS con las MS o NP o NG a estudiar con y sin 6-coumarina a una concentración de 1 mg partícula / ml así como 6-coumarina en disolución en unas concentraciones de 5 ng/ml a 10 µg/ml. A distintos intervalos de tiempo (2,5h, 24h y 48h) se lavaron los pocillos con PBS con la finalidad de eliminar todas aquellas partículas que no se hayan incorporado en las células y posteriormente se añadió 100 µl de buffer de lisis (PBS + 2% SDS + 50 mM EDTA). Con la lisis total de las células, las partículas incorporadas en el interior celular, quedaron libres en el medio facilitando su detección. Las partículas incorporadas en las células se cuantificaron por fluorescencia a 488 nm usado un espectrofotómetro (Varioskan, Thermo Fisher Scientific, Barcelona, Spain). La curva patrón con distintas concentraciones de 6-coumarina (5 ng/ml - 10 µg/ml) en el buffer de lisis. Adicional a esta medida se realizó un estudio cualitativo mediante fotografías después de los lavados en PBS con un microscopio con luz fluorescente (Leica DMIL, Leica Microsystems Switzerland). Las fotografías fueron procesadas por el programa informático Leica Applications Suite Software. En las fotografías se puede apreciar la incorporación ya que la coumarina del medio colorea

levemente las membranas citoplasmáticas y las partículas fluorescentes se aprecian en el interior.

### **3.3.- EVALUACIÓN DE LA INCORPORACIÓN CELULAR DE LAS PARTÍCULAS MEDIANTE RECEPTORES DE FOLATO (UPTAKE)**

La incorporación celular de las partículas puede producirse a través de diversos mecanismos. Uno de ello es a través de los receptores de fólico expresados en la membrana. Puesto que las partículas se vectorizaron con fólico se procedió a valorar y demostrar que la incorporación de estas partículas fue efectivamente a través de receptores de fólico.

Este experimento se llevó a cabo de la misma manera que el anterior (Incorporación celular) siguiendo el mismo protocolo con 6 coumarina, pero bloqueando previamente los receptores de fólico con ácido fólico libre antes de añadir las partículas funcionalizadas y sin funcionalizar. Para conseguir el bloqueo previo de estos receptores, 24 horas después de sembrar las células en la placa de 96 pocillos se cambió el medio por medio DMEM 1% FBS con 1mM de ácido fólico y se dejó incubar durante 2 horas y 30 minutos. Durante este tiempo el ácido fólico en el medio se une a los receptores expresado en la membrana celular bloqueándolos y saturándolos. A continuación se añadieron, las NP y NG funcionalizadas y sin funcionalizar a una concentración de 1mM. Se dejaron incubar durante 2 horas y 30 minutos, tiempo necesario para incorporar las partículas en el interior celular. Pasado dicho tiempo los pocillos se lavaron con PBS con la finalidad de eliminar todas aquellas partículas que no se hayan incorporado en las células y posteriormente se añadió 100 µl de buffer de lisis (PBS + 2% SDS + 50 mM EDTA) para conseguir la lisis total de las células. Se cuantificó la cantidad de partículas incorporadas por fluorescencia a 488 nm usado un espectrofotómetro.

En este ensayo, al bloquear previamente los receptores de fólico la incorporación celular de las partículas funcionalizadas se tiene que ver ralentizada o bloqueada presentando la misma incorporación celular que las partículas no funcionalizadas.

## **4.- ESTUDIOS *IN VIVO***

En el proceso de caracterización de los sistemas llega un momento que los ensayos *in vitro* no pueden aportar más información y presentan ciertas limitaciones a la hora de extrapolar los datos a una situación fisiológica. Para conseguir un estudio completo de los

sistemas es necesario realizar los estudio *in vivo* puesto que solo mediante ellos se puede conocer realmente el comportamiento y las características de los sistemas. Aunque *in vitro* se pueden llegar a reproducir muchas de las condiciones, *in vivo*, hay muchas otras que no se desarrollan, como puede ser la interacción de diversas sustancias que produce el organismo y la reacción de éste ante determinadas estructuras externas. Para conseguir llegar a la clínica se requiere un estudio del tamaño de la partícula, composición formulación, estructura interna y externa, reactividad química y estabilidad pero también es importante conocer su relación con el organismo concretamente la biodistribución, toxicidad y biocompatibilidad (Choi & Frangioni, 2010).

Estos estudios se realizaron con los sistemas microparticulados basados en poliésteres alifáticos sintetizados por spray dryer puesto que son los que presentaron un mayor control sobre la liberación y dentro de estos se seleccionaron los siguientes sistemas: S-LG50; S-LG50:LG75 y S-LG75:L, porque presentaron unos perfiles de liberación más diferentes.

El protocolo fue aprobado por el comité ético de animales de experimentación de la Universidad Complutense de Madrid. Ratas hembras Wistar de  $228,4 \pm 4$  g fueron obtenidas en el animalario de la Universidad Complutense de Madrid, el cual, cumple con los requerimientos establecidos por las regulaciones de animales de experimentación (D.C. 86/609/CEE; R.D. 223/1988; O.M .13/X/1989, R.D. 1201/2005). En todo momento se siguió las directrices obtenidas de la publicación del NIH sobre principios del cuidado de animal de laboratorio revisado en 1985. Los animales se mantuvieron bajo ciclos de luz: oscuridad (12:12 horas) y fueron alimentados con comida y agua estándar *ad libitum*. Desde la fecha de recepción hasta que se comenzó el experimental, se dejaron durante una semana para su habituación y aclimatación.

#### **4.1.- ADMINISTRACIÓN DE LOS SISTEMAS:**

Las micropartículas fueron dispersados en 1 ml de suero salino estéril (0,9% NaCl) y se administraron mediante una inyección subcutánea en el lomo del animal mediante una jeringa estéril con una aguja de 1,2 x 40 mm. Esto fue posible debido al pequeño tamaño de las partículas ya que el diámetro interno de las agujas utilizadas en clínica para la administración parenteral oscila entre 291 y 394 micrómetros (Ye, Kim, & Park, 2010) .

Los animales se dividieron en distintos grupos en función del tratamiento que recibieron, así se obtuvo un total de 4 grupos, cada grupo se subdividió en subgrupos formados por 3 ratas:

1.- Grupo 1: animales a los cuales se les administró micropartículas con TMX.

Subgrupo 1A: animales tratados con MS (PLGA 50/50) – TMX.

Subgrupo 1B: animales tratados con MS (PLGA 50/50 + PLGA 75/25) – TMX.

Subgrupo 1C: animales tratados con MS (PLA + PLGA 75/25) – TMX.

2.- Grupo 2: animales a los cuales se le administró micropartículas sin fármaco.

Subgrupo 2A: animales tratados con MS (PLGA 50/50).

Subgrupo 2B: animales tratados con MS (PLGA 50/50 + PLGA 75/25).

Subgrupo 2C: animales tratados con MS (PLA + PLGA 75/25).

3.- Grupo 3: animales a los se administró TMX en disolución.

4.- Grupo 4: animales a los cuales no se les trató y se mantuvieron como controles.

Después de la administración de cada uno de los tratamientos, a tiempos predeterminados, se recogieron muestras de sangre (0,25 ml) previa anestesia de los animales con un equipo de isoflurano (Burtons, series 5 T.C.V. Kent, UK). La sangre fue extraída de la vena yugular y recogida en tubos de polipropileno previamente heparinizados (75 unidades = 15 µl). La sangre heparinizada fue centrifugada a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C en un centrifuga Sigma 202 M para obtener el plasma al eliminar toda la cadena de coagulación. Las muestras fueron almacenadas y conservadas a -20°C hasta su utilización.

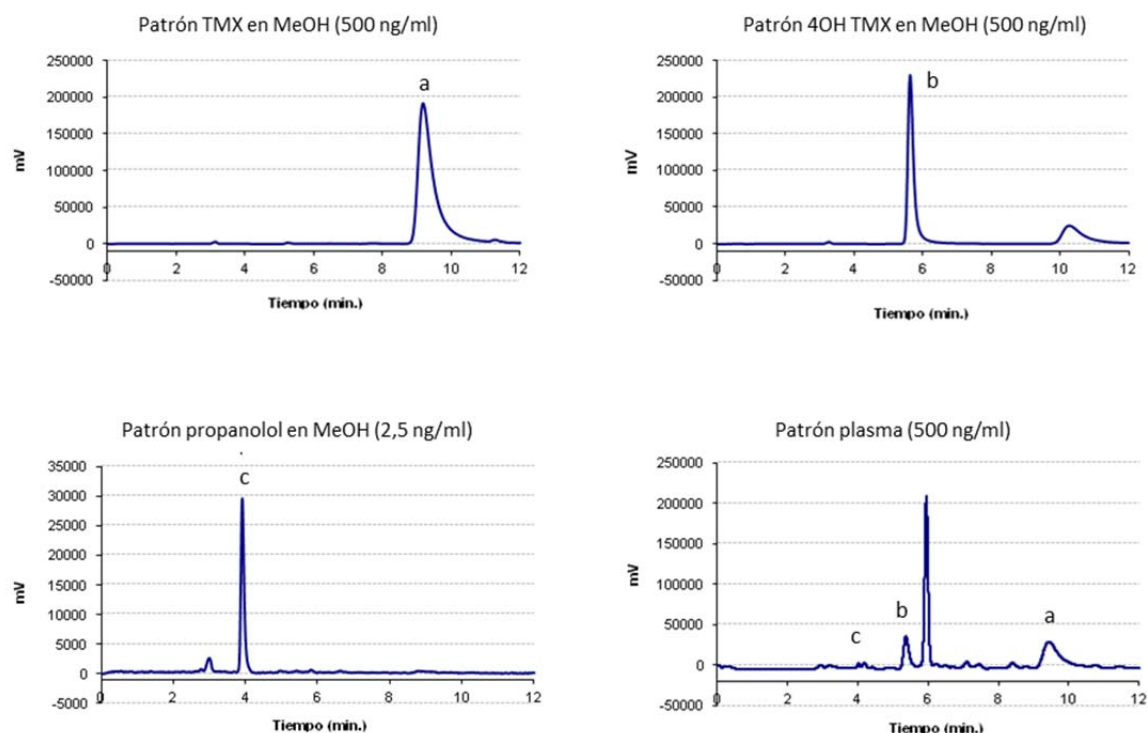
#### 4.2.- DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE TMX Y 4OH-TMX:

Para cuantificar el TMX y uno de sus metabolitos 4-hidroxi-tamoxifeno (4OH-TMX) en el plasma se realizó un proceso de extracción propuesto por Lee y colaboradores (Lee, Ward, Desta, Flockhart, & Jones, 2003).

Protocolo de extracción: a 150  $\mu$ l de plasma se le añadió 150  $\mu$ l de tampón NaOH-glicina 1M (pH 11,3). A continuación se añadió 900  $\mu$ l de una mezcla de hexano - alcohol isopropílico (95/5 v/v). En este punto se vorteo durante 20 minutos para tener una buena extracción. Ambas fases fueron bien separadas por centrifugación a 15.000 rpm durante 5 minutos. La fase orgánica se recuperó y se llevó a evaporación en una estufa a 30°C. El residuo resultante fue reconstituido con metanol grado HPLC. Las muestras fueron cuantificadas por el método anteriormente descrito de cromatografía HPLC.

Los patrones se prepararon bajo las mismas condiciones de extracción que las muestras. Para ello a 150  $\mu$ l de plasma de ratas sanas y sin tratar se añadió volúmenes adecuados de TMX en metanol y 4OH-TMX en metanol para obtener una concentración final comprendida entre 2,5 - 200 ng/ml de 4OH-TMX y 2,5 - 500 ng/ml de TMX. A cada patrón, además, se le añadió 20  $\mu$ l de propanolol en una concentración de 2,5 mg/ml en metanol, como estándar interno. A continuación se sometieron al mismo proceso de extracción que las muestras anteriormente descrito. La eficiencia de extracción fue de  $33,7 \pm 7\%$  para TMX y  $52,7 \pm 13\%$  para el 4OH-TMX. Las curvas de calibración fueron obtenidas por el cálculo del ratio entre el área del pico del propanolol y el área del pico del TMX o 4OH-TMX de cada patrón. Se obtuvieron los siguientes coeficientes de regresión ( $r^2$ ):  $0,997 \pm 0,001$  para TMX y  $0,994 \pm 0,002$  para 4OH-TMX. El tiempo de retención fue del  $9,5 \pm 0,1$  minutos;  $5,4 \pm 0,008$  minutos y  $4,3 \pm 0,01$  minutos para el TMX, 4OH-TMX y propanolol respectivamente (*Figura 37*).

Para verificar la bondad de las medidas se determinó el coeficiente de variación interdía e intradía para tres concentraciones de TMX y 4OH-TMX (25, 500, 5000 ng/ml) obteniendo valores de intradía de 9-10% para el TMX y 6-14% para el 4OH-TMX. Los valores de interdia fueron de 3-8% para el TMX y 3-11% para el 4OH-TMX. Al estar, en todos los casos, por debajo del 15% se confirma la validez de la técnica.



**Figura 37:** Cromatogramas del HPLC (a: tamoxifeno; b: 4OH-TMX y c: propanolol)

#### 4.3.- BIODISTRIBUCIÓN: DETERMINACIÓN DEL TMX Y 4OH-TMX EN LOS ÓRGANOS

Al final del tratamiento, dos meses después de la administración subcutánea, los animales fueron sacrificados en atmósfera de CO<sub>2</sub> y se procedió a la extracción de los órganos, una vez lavados con solución salina (0,9% NaCl), se pesaron y se almacenaron a -80°C hasta su tratamiento posterior.

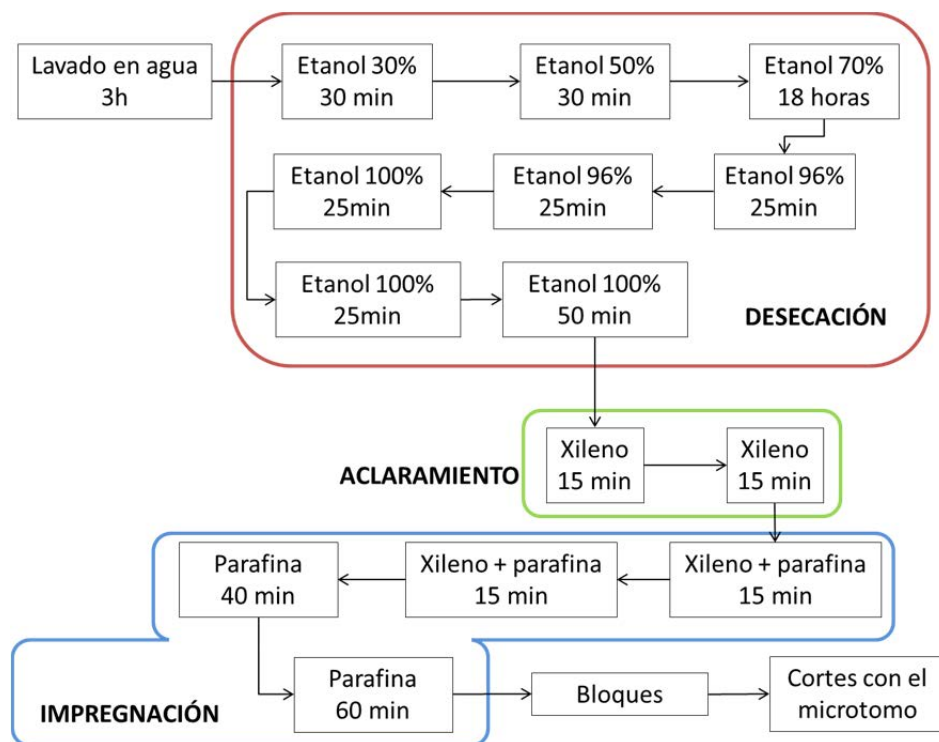
Para este estudio se seleccionaron los siguientes órganos: bazo, hígado, riñón y útero. Se sometieron a un proceso de homogenización y posterior extracción del fármaco, el cual se especifica a continuación:

Protocolo: 0,4 g de tejido fue homogenizado (1:5(w/v)) con un homogenizador (Heidolph RZR 2050 electronic) a 600 rpm en 50 mM de buffer Tris-HCl frío de pH 7,4. El TMX y 4OH-TMX fueron extraídos de los correspondientes homogenizados (150 µl) mediante el mismo proceso que las muestras de sangre, anteriormente descrito, y cuantificado por HPLC.

#### 4.4.- ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

Después del sacrificio de los animales, se extrajo una porción del tejido donde se inyectaron subcutáneamente los sistemas microparticulados o el fármaco en disolución. Estos estudios se llevaron a cabo con el propósito de comprobar la biocompatibilidad de los sistemas. Así mismo, también se llevó a cabo el estudio histológico sobre determinados órganos para demostrar cualquier posible daño estructural o funcional que el fármaco, su metabolito (4OH-TMX) o los sistemas poliméricos hayan podido causar debido a su acumulación en ellos. Los órganos seleccionados para este estudio fueron bazo, hígado, riñón y útero.

Protocolo: una porción de cada uno de los tejidos extraídos, de aproximadamente 1 cm<sup>3</sup>, se fijaron con formol (10% v/v) para su posterior inclusión en parafina. La inclusión en parafina se realizó siguiendo las etapas que se representan en la *Figura 38*. Después de la inclusión se obtuvieron los bloques listos para los cortes histológicos.



**Figura 38:** Etapas de la inclusión en parafina

Cortes de un grosor máximo de 10 µm fueron realizados con un microtomo (Reichert Minot tipe). Posteriormente se secaron en la estufa a 30-35°C durante 24 horas y se sometieron al desparafinado (3 baños de xileno de 10 min, 3 baños de 10 min en alcohol absoluto, 2 baños de 10 min en alcohol de 96° y un baño de 5 min en agua destilada). A continuación las muestras se tiñeron mediante los métodos de coloración “Azul alcian hemalumbre picroíndigo”, “Hematoxilina Eosina” o “Azul de Toluidina” (Humason, 1979). Una vez teñidas se monatron con DePex mountant para su observación y análisis al microscópio. Los protocolos de cada tinción se encuentran esquematizados en la Tabla 11.

Se observaron las muestras mediante de un microscópio con cámara incorporada y se realizaron las correspondientes fotografías para su análisis posterior.

**Tabla 11:** Protocolo de tinción de las muestras histológicas. Cada una de las fases de inmersión con el tiempo en minuto (Romero & Carlo, 2008).

HEMATOXILINA-EOSINA		AZÚL DE TOLUIDINA		TINCIÓN TRICRÓMICA	
	Min.		Min.		Min.
Hematoxilina	10	Azúl de Toluidina	20	Azúl alcian	25
Lavado en agua	30	Lavado en agua	1	Lavado en agua	1
Eosina	2	-	-	Hemalumbre	15
Alcohol 96°	3	Alcohol 96°	30	Lavado en agua	10
Alcohol 96°	3	Alcohol 96°	30	Picrocarmín de índigo	20
Alcohol 96°	5	-	-	Lavado en agua	1
Alcohol 100°	5	Alcohol 100°	30	Alcohol 100°	5
-	-	Alcohol 100°	30	Alcohol 100°	5
Xileno	5	Xileno	5	Xileno	5
Xileno	5	Xileno	5	Xileno	5
Xileno	5	Xileno	5	Xileno	5
Montaje					

Min. = minutos

#### 4.5.- INDICE ORGANOSOMÁTICO

Como complemento al estudio histológico y previamente a él, se analizaron los órganos a través de un estudio gravimétrico. Este ensayo consistió en calcular el coeficiente de los órganos seleccionados obteniendo el peso del órgano después del sacrificio del animal y



dividiéndolo entre el peso total de la rata. Este dato puede proporcionar y corroborar información sobre el estado del órgano. Órganos hipertrofiados, dañados, o afectados por un tumor suelen presentar un incremento en su peso.

#### 4.6.- ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS:

El método no compartimental puede ser usado para determinar parámetros farmacocinéticos sin establecer un modelo compartimental en concreto. De esta forma los cálculos se basaron en el área bajo la curva de la concentración plasmática versus tiempo en el momento cero ( $AUC_0^\infty$ ) y en el primer momento de la curva ( $AUMC_0^\infty$ ). El  $AUMC_0^\infty$  es el área debajo de la curva de la concentración plasmática contra el tiempo y fue calculada por el método trapezoidal como el  $AUC_0^\infty$ . De los valores de  $AUC_0^\infty$  y  $AUMC_0^\infty$  se ha obtenido el tiempo de residencia medio del fármaco (MRT) (Ecuación 6). Otros diversos valores farmacocinéticos fueron calculados. Se valoró la biodisponibilidad en magnitud del fármaco desde los sistemas teniendo en cuenta tanto al biodisponibilidad absoluta como la relativa:

Biodisponibilidad absoluta (AB%): proporciona información sobre la fracción de la dosis administrada que accede al torrente sanguíneo inalterada (por la vía a estudiar) en comparación con la administración directa intravenosa (por la cual se consigue el 100% de biodisponibilidad). Para el cálculo de este parámetro se administró TMX en disolución a una dosis de 2,8 mg/kg rata vía intravenosa (i.v.).

Biodisponibilidad relativa (RB%): proporciona información sobre la fracción de la dosis administrada que accede al torrente sanguíneo inalterada (por la vía a estudiar) en comparación con lo que accede tras la administración de un patrón por la misma vía. Para el cálculo de este parámetro se consideró como patrón la administración de TMX en disolución vía subcutánea (s.c.).

La relación de los metabolitos (MR), la biodisponibilidad relativa (RB%) y la biodisponibilidad absoluta (AB%) del TMX y 4OH-TMX fue calculado a través de sus respectivas ecuaciones (Ecuación 6). La constante de eliminación ( $K_e$ ) fue obtenida de la representación final usando una regresión lineal.

$$MRT = \frac{AUMC_0^\infty}{AUC_0^\infty} \quad MR = \frac{AUC_{4OH-TMX}}{AUC_{TMX}}$$

$$AB (\%) = \frac{AUC_{Sistema}}{AUC_{IV}} \times 100 \quad RB (\%) = \frac{AUC_{TMX\ solución}}{AUC_{Sistema}} \times 100$$

**Ecuación 6:** ecuaciones farmacocinéticas. MRT: tiempo medio de residencia del fármaco, MR: ratio de los metabolitos, RB%: biodisponibilidad relativa y AB%: biodisponibilidad absoluta.

#### 4.7.- PARÁMETROS BIOQUÍMICOS:

Concentraciones plasmáticas de lactato deshidrogenasa (LDH), creatina (CRT), aspartato aminotransferasa (AST/GOT) y alanina aminotransferasa (ALT/GPT) fueron determinadas espectrofotométricamente usando kits comerciales de BioSystems (Barcelona, España). La finalidad de estas determinaciones fue completar la información proporcionada por los estudios histológicos y poder valorar un posible daño por parte de los sistemas o del fármaco administrado.

La lactato deshidrogenasa se ve aumentada por numerosas causas, una de las cuales es la insuficiencia hepática grave. La AST y la ALT se encuentran en concentraciones séricas elevadas en el caso de enfermedades hepáticas y la creatina tiene como uso la evaluación la función renal (pérdida de la función de las nefronas) (*Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics* 2005) (*Effects of disease on clinical laboratory tests* 2001). Estos parámetros se midieron para comprobar el estado funcional tanto del hígado como de los riñones y como un dato complementario.

#### 5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el programa SPSS 19 para realizar el estudio estadístico basado en el análisis de la varianza a través de un ANOVA de un factor. Previamente se comprobó que los datos analizados cumplen con los supuestos previos que conlleva este estudio en la distribución de la variable cuantitativa a evaluar. Una vez confirmados los requisitos de normalidad y homocedasticidad, se asumió igualdad de varianzas y normalidad. Cuando existió significación estadística con el estudio del ANOVA se procedió a realizar un contraste o comparaciones múltiples a posteriori Bonferroni. El estudio estadístico se llevó a cabo con un nivel de significación del 95% ( $p < 0,05$ ).



## **RESULTADOS**



En este apartado se va a proceder a exponer los resultados obtenidos en función de cada uno de los sistemas sintetizados y diseñados (micropartículas, nanopartículas y nanogeles), comentando previamente los resultados correspondientes a la síntesis de los monómeros y polímeros necesarios para los sistemas.

## 1.- SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS MONÓMEROS Y COPOLÍMEROS

La síntesis de distintos monómeros y polímeros en el laboratorio fue necesario para conferir, a los distintos sistemas, las características y comportamiento más apropiados para mejorar el perfil de liberación del fármaco. Para las nanopartículas sintetizadas por emulsión, el copolímero PLGA-PEG-FOL fue necesario para la vectorización con ácido fólico. En el caso de los nanogeles sintetizados por polimerización radicalaria, fue necesario sintetizar el monómero NPAM y el monómero 2AAECM puesto que no están comercializados. Éstos aportaron sensibilidad a pH y la susceptibilidad de ser vectorizados respectivamente.

Estos monómeros y copolímeros fueron sintetizados en el laboratorio mediante diversas reacciones descritas previamente en el apartado de materiales y métodos. El rendimiento de la reacción de síntesis del copolímero PLGA-PEG-FOL fue muy elevado (68%) incluso la síntesis de los productos intermedios (PLGA-PEG y PLGA activado) (81 – 82% respectivamente) (*Tabla 12*). En el caso de los monómeros necesarios para los NG, el rendimiento de la técnica fue inferior, 20% para el NPAM y 52% para el 2AAECM como se observa en la *Tabla 12*.

**Tabla 12:** Rendimiento de la síntesis de los monómeros y copolímeros.

MONÓMERO/COPOLÍMERO	RENDIMIENTO (%)
PLGA activado	81,8
PLGA-PEG	81
PLGA-PEG-FOL	68
NPAM	20,4
NH-BOC	23,6
2AAECM	52,2

Por lo tanto, previa a la síntesis de las partículas por emulsión o de los nanogeles por polimerización, se caracterizaron mediante FTIR y  $^1\text{H}$ -RMN los monómeros, polímeros y

copolímeros sintetizados así como los reactivos/productos comerciales de partida. En la (Tabla 13) se esquematiza la caracterización realizada para cada polímero.

**Tabla 13:** Esquema de la caracterización realizada para cada polímero.

SISTEMAS	MONÓMEROS, POLÍMEROS Y COPOLÍMEROS	CARACTERIZACIÓN
NP por emulsión	PLGA resomer®(comercial) PEG bisamina(comercial) Ácido fólico(comercial) PLGA-PEG PLGA-PEG-FOL	FTIR
NG por polimerización	NPAM 2AAECM NIPA (comercial) NMBA (comercial) ClAc (comercial)	FTIR y <sup>1</sup> H-RMN

### 1.1.- Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Mediante el FTIR se caracterizaron los monómeros y copolímeros sintetizados a través de la detección de los grupos funcionales presentes en su estructura química. Con esta técnica se detectó los niveles que corresponden a vibraciones de tensión-contracción y flexiones de los enlaces y otros movimientos complejos de las moléculas. En todos los casos se confirmó que la síntesis de los monómeros y copolímeros fue satisfactoria puesto que presentaron la estructura química buscada con los grupos funcionales característicos.

#### **A.- FTIR del copolímero PLGA-PEG-FOL para las nanopáticas:**

En el caso del copolímero PLGA-PEG-FOL, se analizaron los polímeros comerciales de partida: PLGA resomer®, PEG bisamina y ácido fólico por separado confirmando la absorbancia de sus grupos funcionales. Posteriormente, se comprobó la presencia de los mismos en el copolímero posteriormente sintetizado PLGA-PEG y el copolímero final vectorizado PLGA-PEG-FOL. Los resultados obtenidos del análisis se especifican a continuación:

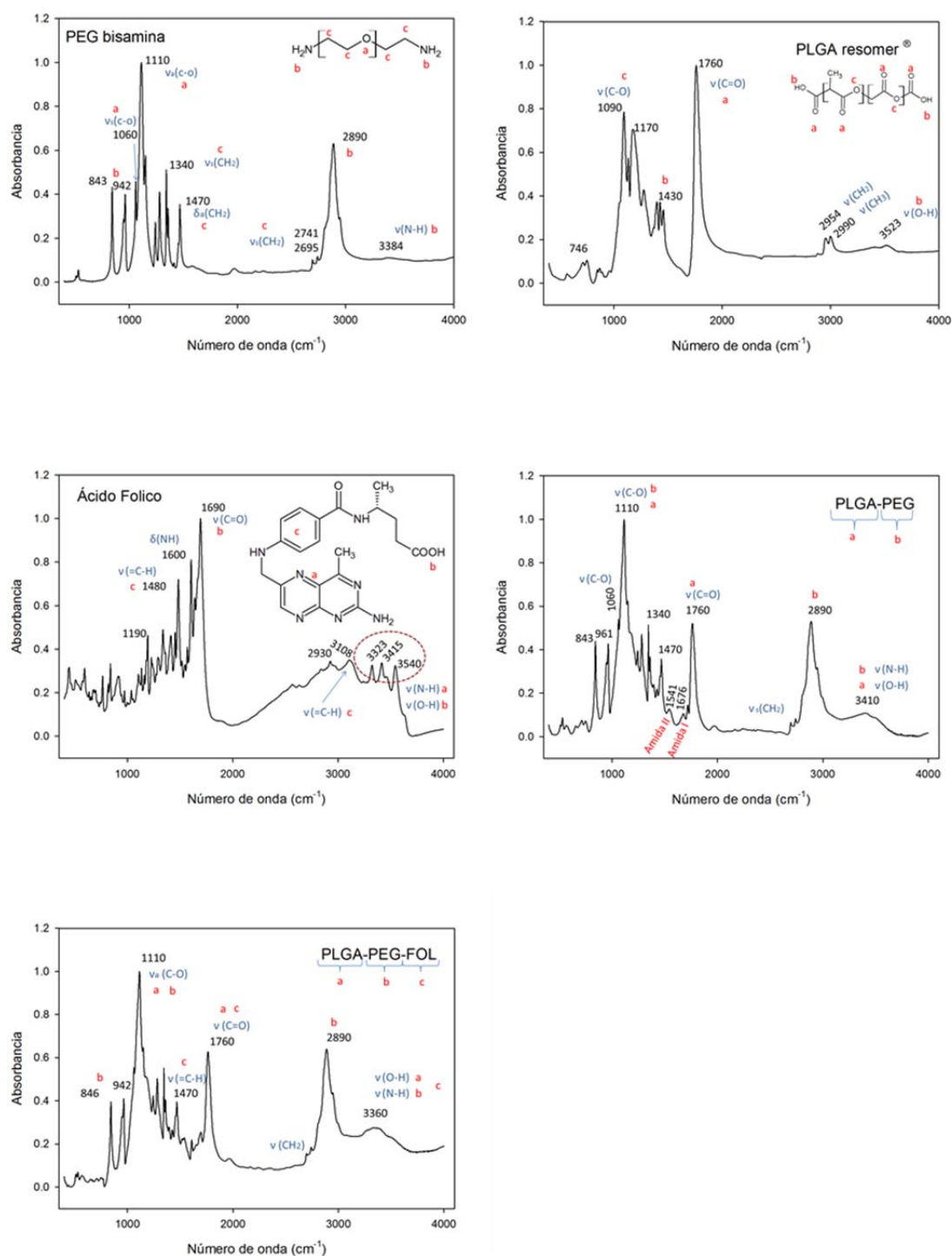
PEG bisamina se caracteriza por presentar dos grupos amina en sus dos extremos y el oxígeno que forma un éter. Las aminas presentan una banda de estiramiento N-H en la zona  $3300 - 3500 \text{ cm}^{-1}$  y bandas de flexión en  $650 - 900 \text{ cm}^{-1}$ . La banda de tensión asimétrica a  $1110 \text{ cm}^{-1}$  y la simétrica a  $1060 \text{ cm}^{-1}$  corresponde al enlace C-O (*Figura 39*).

PLGA resomer® presenta grupos ésteres en su estructura y dos grupos ácidos en las terminaciones. El grupo éster (C=O) presenta una banda de estiramiento cerca de  $1760 \text{ cm}^{-1}$  y el enlace C-O una banda de estiramiento en la zona  $1090 \text{ cm}^{-1}$ , pueden aparecer dos o más bandas siendo una más fuerte que las otras. En relación a los grupos ácidos de su estructura química R-COOH: el enlace O-H se refleja por una banda de estiramiento, generalmente muy ancha, a  $3523 \text{ cm}^{-1}$ , y el enlace C=O presenta una banda de estiramiento ancha a  $1760 \text{ cm}^{-1}$  (*Figura 39*).

Ácido fólico: Presenta una estructura química más compleja formada por un grupo pterina, un grupo PABA (ácido p-aminobenzoico) y un ácido glutámico con dos grupos ácidos terminales. A  $1690 \text{ cm}^{-1}$  se encuentra la señal de tensión del carbonilo C=O, entre  $3544 - 3323 \text{ cm}^{-1}$  la tensión debida al enlace O-H del ácido glutámico y al N-H de la pterina. La señal de flexión a  $1600 \text{ cm}^{-1}$  procede de la vibración de la amina (NH). A  $1570 \text{ cm}^{-1}$  se detecta una amida II. Las insaturaciones del benceno se reflejan en la banda de tensión a  $3108 \text{ cm}^{-1}$  (*Figura 39*).

Tanto el copolímero PLGA-PEG como el PLGA-PEG-FOL han presentado bandas de absorción correspondientes a los grupos funcionales de cada polímero confirmando su síntesis de forma satisfactoria. En las gráficas de la *Figura 38* se pueden observar los espectros del FTIR obtenidos.





**Figura 39:** Espectros de absorción de la región infrarroja de polietilenglicol bisamina (PEG bisamina), PLGA resomer®, ácido fólico, copolímero PLGA-PEG y el PLGA-PEG-FOL.

**B.- FTIR de los monómeros utilizados en la síntesis de los nanogeles (NG)**

Los monómeros sintetizados en el laboratorio han mostrado, mediante los espectros de infrarrojos, que presentan los grupos funcionales esperados en su estructura, como se observan en las gráficas de la *Figura 40*.

El monómero NPAM: a  $3034\text{ cm}^{-1}$  hay una vibración de tensión de los grupos vinilos ( $=\text{C-H}$ ) aromáticos del anillo piridínico. La vibración de tensión producida por el grupo N-H detectada a  $3232\text{ cm}^{-1}$ . La vibración de tensión a  $1240\text{ cm}^{-1}$  corresponde al enlace C-N y  $1533\text{ cm}^{-1}$  a la amida II.

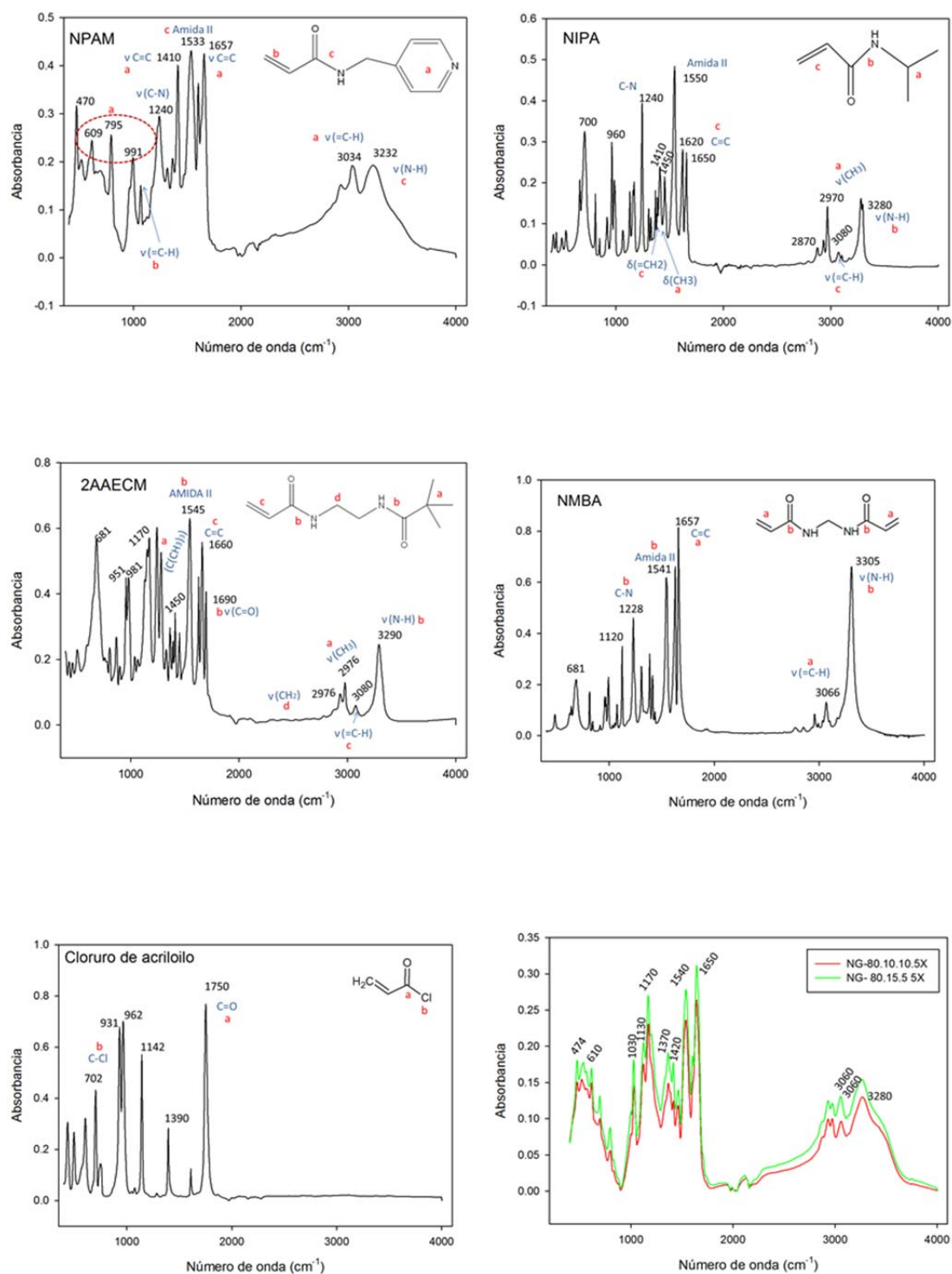
El monómero NIPA: en su estructura destaca el grupo isopropilo. El espectro FTIR de este monómero presenta una banda a  $1383 - 1365\text{ cm}^{-1}$  característico del isopropilo debido a la deformación del  $\text{CH}_3$ . La vibración de tensión producida por el grupo N-H se detecta a  $3280\text{ cm}^{-1}$ .

El monómero 2AAECM: A  $1545\text{ cm}^{-1}$  se encuentra la vibración debida a la amida II, a  $3290\text{ cm}^{-1}$  la vibración de tensión del enlace N-H y entre  $1390\text{-}1285\text{ cm}^{-1}$  se encuentra la vibración producida por el grupo terc-butilo ( $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ).

El monómero NMBA usado como entrecruzante, presenta banda a  $1541\text{ cm}^{-1}$  característica de la amida II.

En todos los monómeros se detecta una banda de la vibración de la tensión C-H próxima a un grupo vinilo ( $=\text{C-H}$ ), confirmando la presencia de este grupo funcional necesaria para la polimerización radicalaria, método por el cual se sintetizaron los nanogeles.

En las gráficas de la *Figura 40* se observa los espectros FTIR de los nanogeles así como de los distintos monómeros (tanto los comerciales como los elaborados en el laboratorio) que forman parte de su estructura.



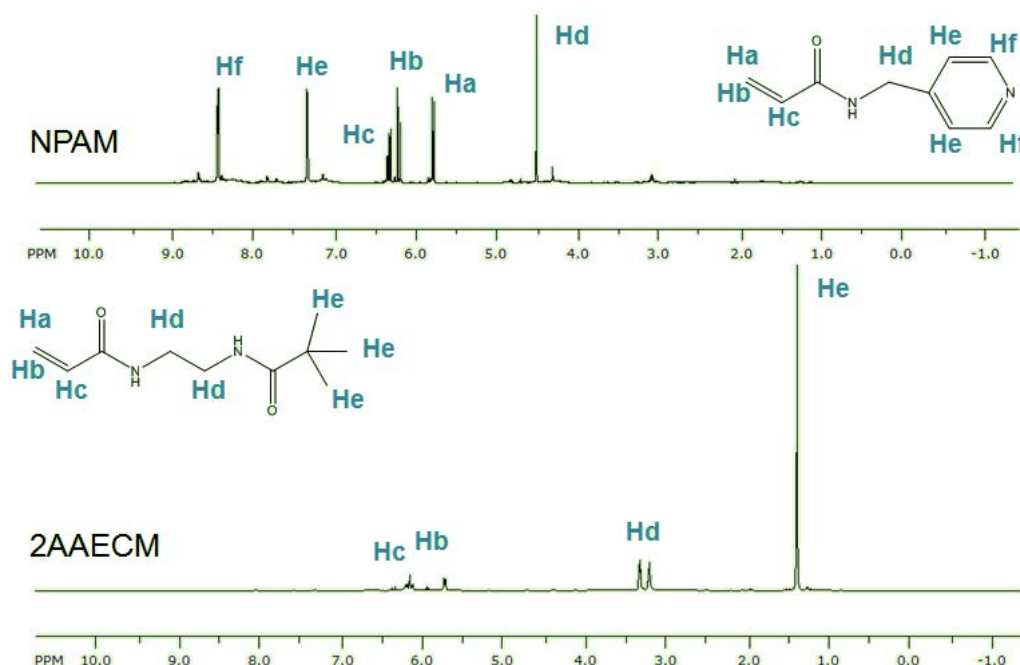
**Figura 40:** Espectros de la región infrarroja de los monómeros NIPA, NPAM, 2AAECM, NMBA, cloruro de acrililo y los nanogeles NG 80:10:10.5X y NG 80:15:10.5X.

## 1.2.- Resonancia Magnética Nuclear de Protones ( $^1\text{H}$ -RMN)

En el análisis de la resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$ -RMN) se ha obtenido el espectro de los protones de las moléculas correspondientes analizadas. Se han podido caracterizar cada una de las moléculas sintetizadas a través de la identificación de cada uno de los protones. Junto con los datos recogidos del FTIR, se complementa la información sobre la estructura química de los monómeros sintetizados (*Figura 41*).

$^1\text{H}$ -RMN del monómero NPAM: Los protones correspondientes al grupo vinilo se encuentran desplazados a 5,7; 6,2 y 6,3 ppm. Las señales a 8,8 y 7,3 ppm corresponden al anillo piridínico del monómero que proviene del 4 AMP y a 4,4 ppm se recoge la señal debida al protón más cerca del anillo piridínico.

$^1\text{H}$ -RMN del monómero 2AAECM: los desplazamientos producidos a 5,7; 5,9 y 6,1 corresponden nuevamente al grupo vinílico de la misma manera que el NPAM. A 3,3 y 3,2 ppm se registra la señal correspondiente a los grupos metilenos que se encuentran entre las amidas. Por último la señal a 1,37 ppm pertenece al desplazamiento químico producido por los protones del grupo terc-butoxi.



**Figura 41:**  $^1\text{H}$ -RMN de los monómeros NPAN y 2AAECM.

## **2.- SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS**

Se han utilizado tres métodos de síntesis distintos, buscando obtener partículas con diferentes características que mejoren la terapia antitumoral con el tamoxifeno. Como resultado de cada método se ha conseguido obtener un tipo de partículas con unas propiedades que, a continuación, se evaluarán a través de distintos métodos de caracterización, previamente descritos en la sección de materiales y métodos. Las tres técnicas empleadas fueron atomización y secado (spray dryer), emulsión/evaporación y polimerización radicalaria. Todas ellas, han resultado técnicas adecuadas para la síntesis de estos sistemas poliméricos.

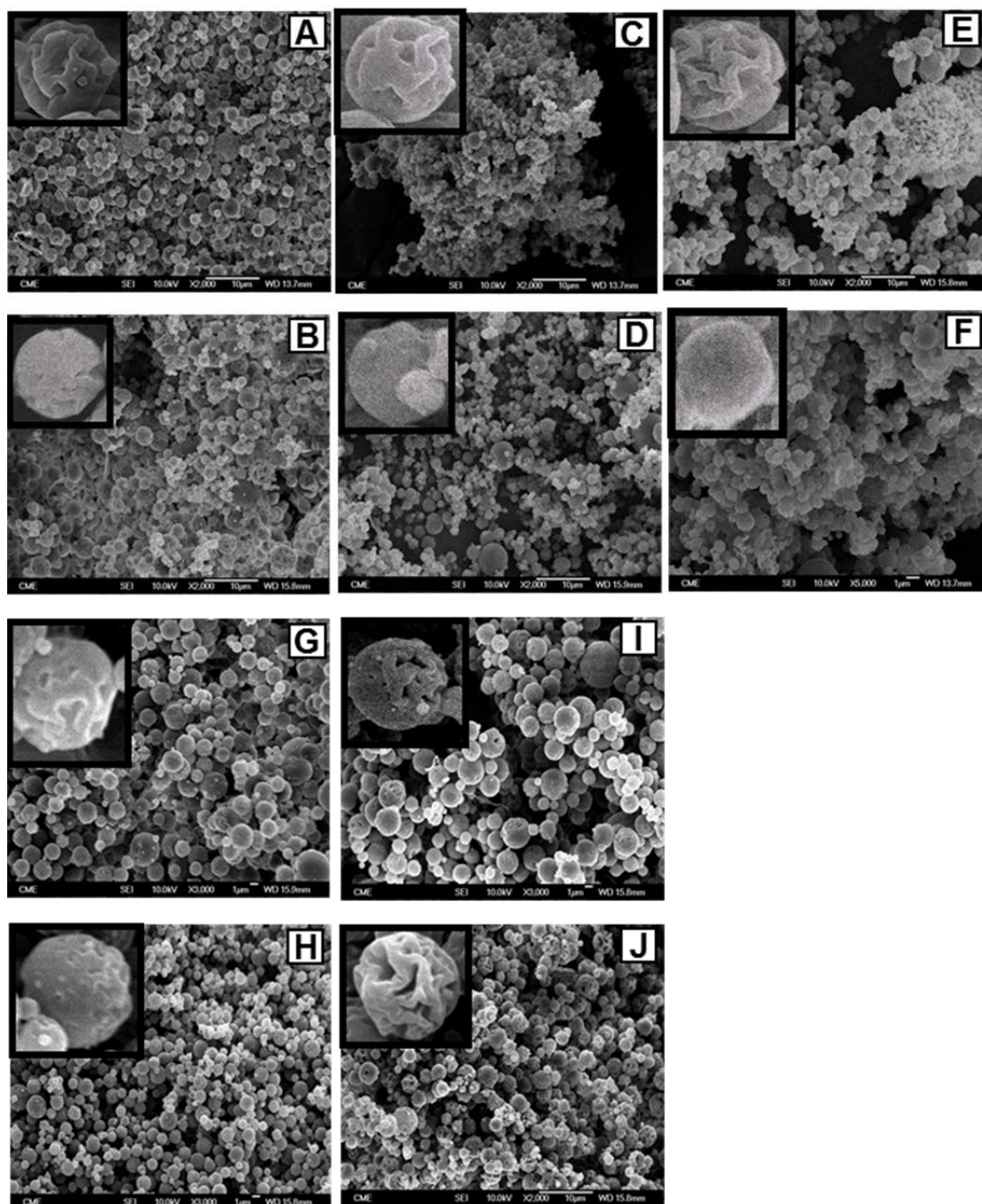
A continuación se exponen los resultados de la caracterización de las distintas partículas sintetizadas por los tres métodos seleccionados.

### **2.1.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM) Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)**

Mediante estas técnicas se han obtenido imágenes (*Figuras 42, 43, 44, 45, 46, 47*) donde se puede observar la morfología y el tamaño y calcular la distribución de tamaños (*Anexo II*) de las distintas partículas (microesferas, nanopartículas y nanogeles).

#### **A.- Micropartículas basadas en poliésteres alifáticos sintetizadas por atomización y secado:**

El rendimiento de esta técnica fue del 36% – 63%. En la *Figura 42* se observan que las partículas obtenidas son muy esféricas con la superficie ligeramente rugosa. El tamaño medio se situó entre  $0,80 \pm 0,31$  -  $1,93 \pm 0,74 \mu\text{m}$  (*Tabla 14*). Sin embargo el porcentaje de partículas de tamaño nanométrico fue muy elevado en algunas síntesis, como fue el caso de las partículas S-LG50, llegando a ser hasta el 77% de la muestra. El índice de polidispersidad (U) estuvo comprendido entre 2,23 y 1,43 considerándose muestras de elevada dispersión de tamaños (*Anexo II*).



**Figura 42:** FEG-SEM imágenes de microesferas sintetizadas por atomización y secado (Spray Dryer): A) S-LG75; B) S-LG75-TMX; C) S-LG50; D) S-LG50-TMX; E) S-LG50:LG75; F) S-LG50:LG75-TMX; G) S-LG50:L; H) S-LG50:L-TMX; I) S-LG75:L; J) S-LG75:L-TMX.

**Tabla 14:** Diámetros medios calculados a partir de fotografías de FEG-SEM de las microesferas sintetizadas por atomización y secado, la polidispersidad (U), el rendimiento de la técnica (%) y el porcentaje de nanopartículas obtenidas.

SISTEMAS		U	Diámetro medio ( $\mu\text{m}$ )	Rendimiento (%)	Porcentaje de nanopartículas (250 nm – 1 $\mu\text{m}$ )
<b>S-LG75</b>	Con TMX	2,23	$1,5 \pm 0,9$	37,7	42,86%
	Sin TMX	1,62	$1,6 \pm 0,8$	46,7	28,79%
<b>S-LG50</b>	Con TMX	2,22	$1,4 \pm 0,7$	36,2	40,82%
	Sin TMX	1,43	$0,8 \pm 0,3$	62,9	77,73%
<b>S-LG50:LG75</b>	Con TMX	1,43	$1,5 \pm 0,6$	53,1	26,76%
	Sin TMX	1,60	$1,7 \pm 0,8$	45,6	23,91%
<b>S-LG50:L</b>	Con TMX	1,69	$1 \pm 0,5$	46,1	55,96%
	Sin TMX	1,47	$1,7 \pm 0,8$	48	23,09%
<b>S-LG75:L</b>	Con TMX	1,67	$1,1 \pm 0,6$	48,3	48,16%
	Sin TMX	1,67	$1,9 \pm 0,7$	60,2	11,25%

S-LG75 Poli (láctico-co-glicólico) 75/25; S-LG50 Poli (láctico-co-glicólico) 50/50; S-LG50:LG75 Poli (láctico-co-glicólico) 50/50 + Poli (láctico-co-glicólico) 50/50 (50%); S-LG50:L Poli (láctico-co-glicólico) 50/50 + Poli (D,L-láctico) (75/25%); S-LG75:L Poli (láctico-co-glicólico) 75/25 + Poli (D,L-láctico) (75/25%).

El estudio estadístico ha demostrado que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos y especificados.

#### **B.- Nanopartículas basadas en poliésteres alifáticos sintetizadas por emulsión/evaporación:**

Para optimizar la síntesis de las nanopartículas (NP) con las mejores propiedades, se procedió a la puesta a punto de la técnica ajustando las condiciones más óptimas en función de cantidad de emulgente (PVA) y fármaco (TMX). Las concentraciones de emulgente estudiadas fueron del 0,5%, 1% y 2% y las concentraciones de TMX probadas fueron 5%, 10% y 20%.

En todas las condiciones establecidas, las NP presentaron una morfología esférica con la superficie lisa sin rugosidades ni poros (*Figura 43*). Las partículas sintetizada en las condiciones de 0,5% de PVA fueron las partículas de menor tamaño ( $72 \pm 14$  nm) mientras que las partículas sintetizadas con 1% PVA y 2% PVA presentaron un mayor tamaño,  $141 \pm 17$  nm y  $372 \pm 91$  nm respectivamente (*Tabla 15*). En ningún caso se observaron restos de PVA en las muestras, lo que confirmó que la purificación se llevó a cabo adecuadamente. La polidispersidad obtenida comprendió entre 1,06 – 1,2. Otro aspecto que se estudió en el proceso de síntesis, fue la eficiencia de incorporación del fármaco en función de la cantidad de TMX añadido inicialmente. En las imágenes se observó que las partículas con 20% TMX presentaron un tamaño similar ( $77 - 92$  nm) al de las partículas con 10% TMX ( $72 - 109$  nm).

**Tabla 15:** Diámetros medios calculados a partir de fotografías de FEG-SEM de las nanopartículas sintetizadas por emulsión/evaporación y la optimización, polidispersidad (U) y el rendimiento de la técnica (%).

SISTEMAS	VARIABLE	U	Diámetro medio <sup>+</sup> (nm)	Rendimiento (%)
E-LG50	0,5 % PVA <sup>*</sup>	1,2	$72 \pm 14$	87,4
E-LG50	1% PVA <sup>*</sup>	1,06	$141 \pm 17$	48,2
E-LG50	2% PVA <sup>*</sup>	1,2	$372 \pm 91$ <sup>a</sup>	242,3
E-LG50 E-LG50:LG75 E-LG75:L	5% TMX*	-	-	75,6 80,5 78,7
E-LG50 E-LG50:LG75 E-LG75:L	10% TMX*	1,09 1,15 1,26	$75 \pm 11$ $109 \pm 20$ $72 \pm 17$	82 83,6 73,9
E-LG50 E-LG50:LG75 E-LG75:L	20% TMX*	1,13 1,25 1,19	$91 \pm 16$ $92 \pm 19$ $77 \pm 15$	76,8 74,8 74,6

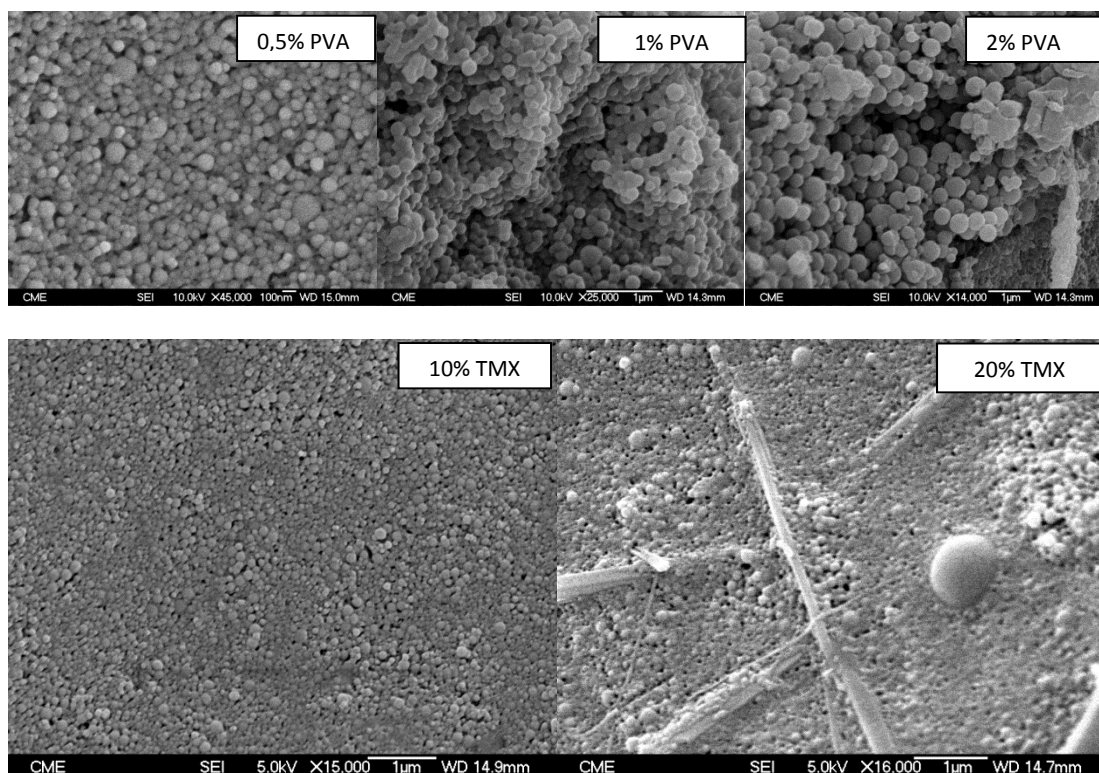
<sup>\*</sup> Síntesis sin fármaco. \*síntesis realizadas con la variable % PVA constante y fijada en 0,5% PVA.

<sup>+</sup>Valores expresados con un valor medio  $\pm$  desviación estándar (n=500)

a: Existen diferencias estadísticamente significativas con todos los demás sistemas y todas las demás variables ( $p < 0,05$ )



Se destaca la presencia de cristales de un gran tamaño en las síntesis con 20% de TMX, posiblemente formadas por el fármaco que no se ha incorporado en las partículas y que no se ha podido eliminar en la purificación con agua por sus características hidrofóbicas (*Figura 43*). Este estudio morfológico no se realizó en las partículas sintetizadas con un 5% TMX puesto que previamente se descartaron debido a la baja eficiencia de incorporación del fármaco.



**Figura 43:** FEG-SEM imágenes de partículas sintetizadas por la técnica de emulsión/evaporación. Composición copolimérica PLGA 50/50 (E-LG50), en distintas condiciones de síntesis. E-LG50 sin TMX con 0,5% PVA, 1% PVA y 2% PVA en la fase continua. NP E-LG50-TMX con 10% TMX y 20% TMX (0,5% PVA en la fase continua).

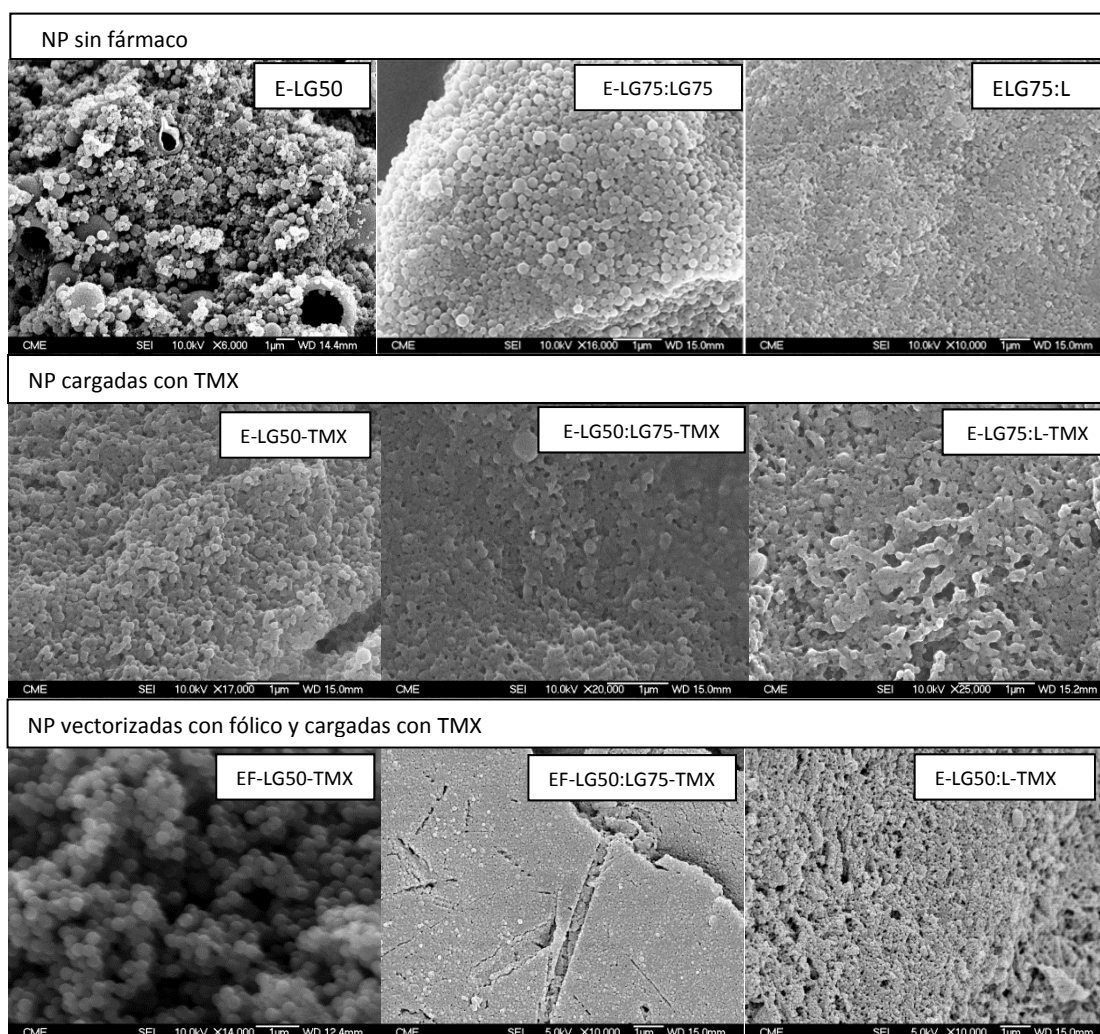
Las condiciones finales seleccionadas para la síntesis de los sistemas por la técnica de emulsión/evaporación fueron 0,5% de PVA y 10% de TMX por presentar un menor tamaño y una mayor eficiencia de incorporación de TMX.

Finalmente, todos los sistemas, incluidas las vectorizadas con ácido fólico, tuvieron un tamaño nanométrico (*Figura 44*) siendo las más pequeñas las E-LG50 sin fármaco ( $72 \pm 14$  nm) y las más grandes E-LG50:LG75 sin fármaco ( $147 \pm 21$  nm). El índice de polidispersidad (U) se encontró entre 1 – 1,2. El rendimiento de esta técnica fue de 42 – 44% para los sistemas vectorizados con fólico y de 76 – 87% para los no vectorizados (*Tabla 16*).

**Tabla 16:** Diámetros medios (nm) calculados a partir de fotografías de FEG-SEM, polidispersidad (U) y el rendimiento de la técnica (%) de síntesis de NP por emulsión/evaporación.

SISTEMAS		U	Diámetro medio (nm)	Rendimiento (%)
<b>SIN VECTORIZAR</b>				
E-LG50	Con TMX	1,09	75 ± 11	84,4
	Sin TMX	1,2	72 ± 14	87,4
E-LG50:LG75	Con TMX	1,15	109 ± 20	86,9
	Sin TMX	1,09	147 ± 21 <sup>a</sup>	79,8
E-LG75:L	Con TMX	1,26	72 ± 17	76,4
	Sin TMX	1,14	119 ± 20	79,2
<b>VECTORIZADAS CON FÓLICO</b>				
EF-LG50	Con TMX	1,1	75 ± 12	42,1
EF-LG50:LG75	Con TMX	1,06	89 ± 11	44,6
EF-LG50:L	Con TMX	1,06	90 ± 11	44,3

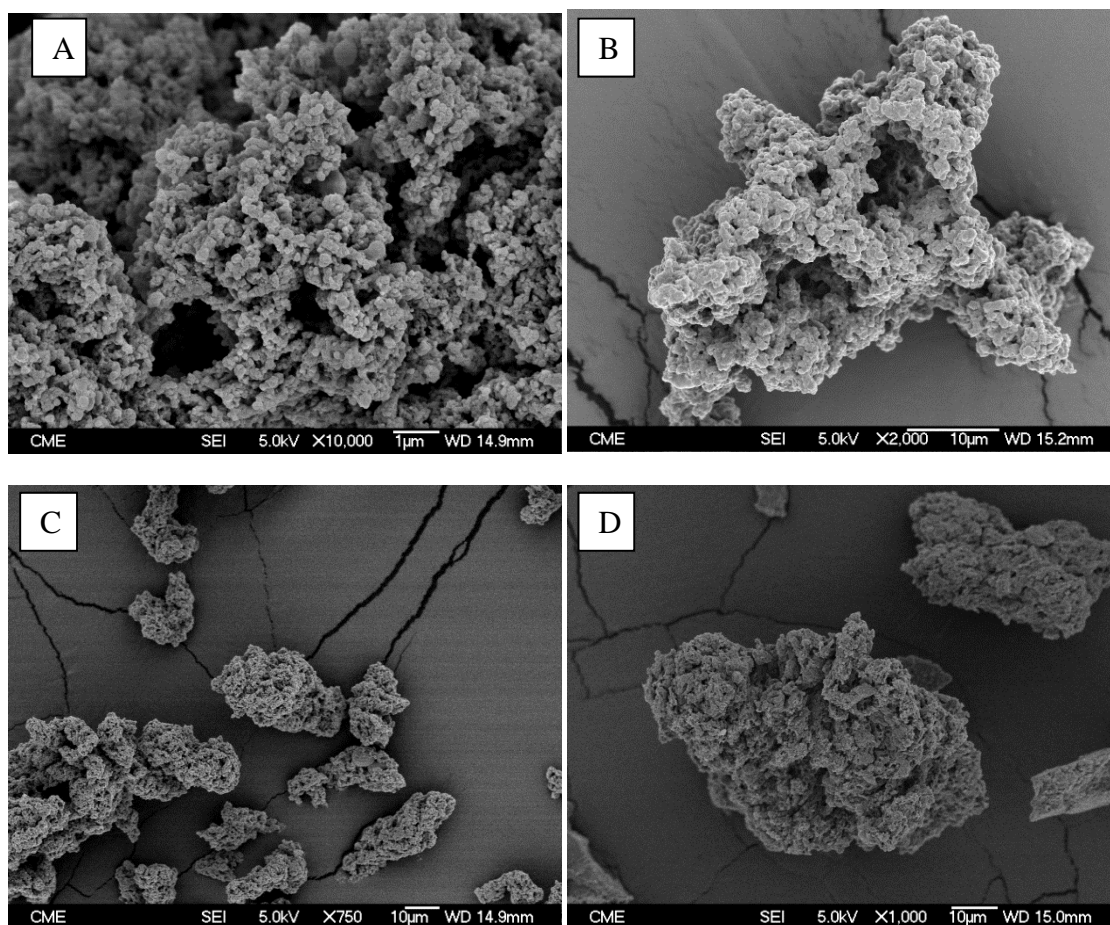
<sup>a</sup> Presenta diferencias significativas con todo el resto de sistemas excepto E-LG50:LG75 –TMX y E-LG75:L para un nivel de significación ( $p < 0,05$ )



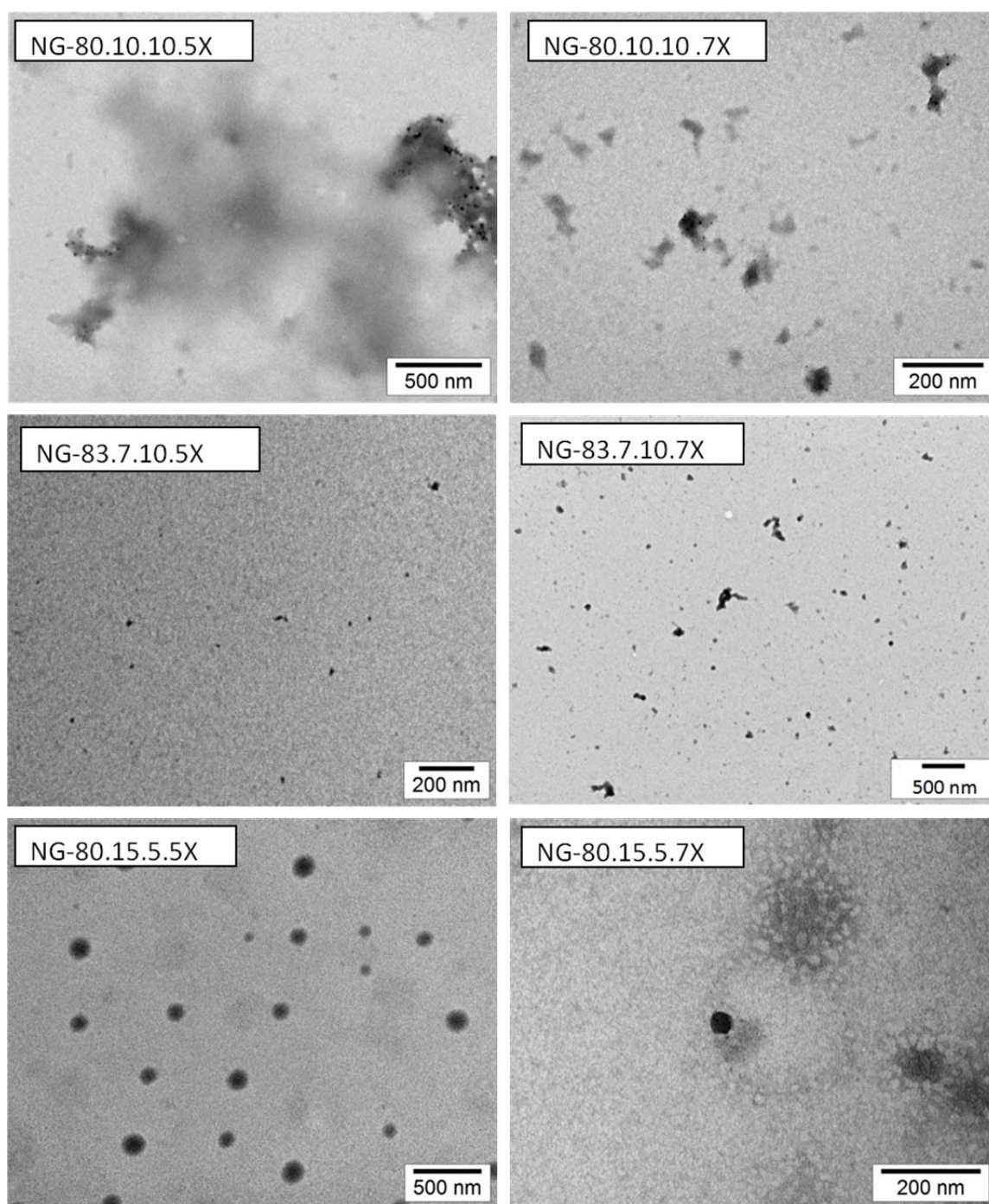
**Figura 44:** FEG-SEM imágenes de las distintas partículas sintetizadas por la técnica de emulsión/evaporación bajo las condiciones de 0,5% PVA y 10% TMX para el caso de los sistemas con TMX, y las NP funcionalizadas con ácido fólico

**C.- Nanogeles sintetizados mediante polimerización radicalaria:**

Los nanogeles (NG) obtenidos por esta técnica tuvieron un tamaño medio comprendido entre  $37 \pm 9$  y  $265 \pm 72$  nm con una polidispersidad (U) de 1,02 – 1,15. El rendimiento de la polimerización fue entre 9,9 y 21,13% (Tabla 17). A través de las imágenes del microscopio electrónico de barrido se observa que los sistemas sin funcionalizar tienen una morfología con una tendencia esférica pero con una elevada tendencia a la agregación entre ellas (Figura 45). Sin embargo a través del TEM ya se pueden observar las partículas más individualizadas confirmando esa morfología esférica (Figura 46). Estas pequeñas diferencias entre las imágenes se deben al diferente procesamiento de la muestra necesario para analizarla a través de cada uno de los microscopios. Cuando las partículas se funcionalizaron con ácido fólico sí que se observa, a través del TEM (Figura 47), que los sistemas se encuentran interaccionando unas a otras formando como cadenas de nanogeles.



**Figura 45:** FEG-SEM fotografías de los nanogeles sin funcionalizar A) NG-80.10.10.5X; B) NG-80.10.10.7X; C) NG-83.7.10.5X; D) NG-83.7.10.5X



**Figura 46:** Fotografías de microscopio electrónico de transmisión (TEM) de los nanogeles sintetizados por polimerización sin funcionalizar.

**Tabla 17:** Diámetros medios (nm) calculados a partir de fotografías de FEG-SEM, polidispersidad (U) y el rendimiento de la técnica (%) de síntesis de NG por polimerización.

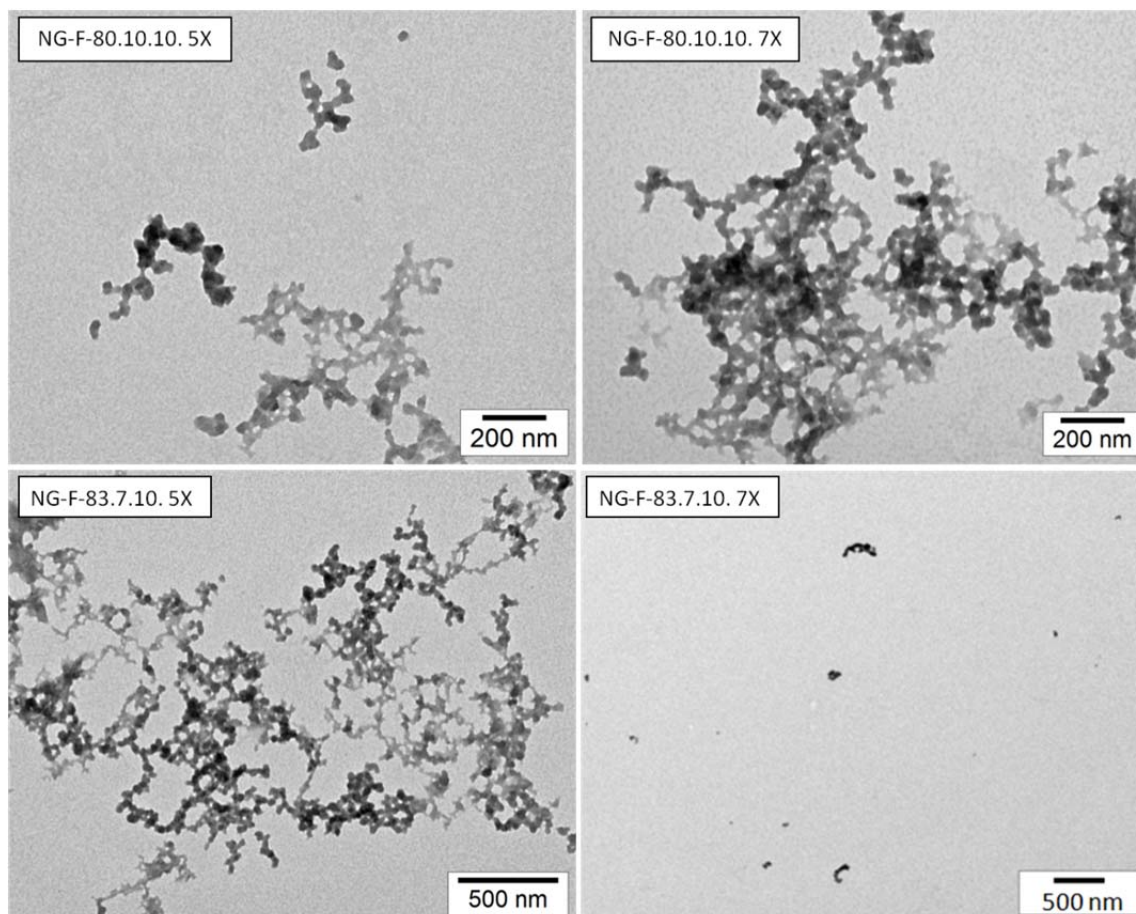
SISTEMAS		U	Diámetro medio (nm)	Rendimiento (%)
SIN VECTORIZAR				
NG-80.15.5.5X	Sin TMX	-	-	13,2
NG-80.15.5.7X	Sin TMX	-	-	14,8
NG-80.10.10.5X	Sin TMX	1,05	128 ± 17	9,9
NG-80.10.10.7X	Sin TMX	1,05	126 ± 18	9,7
NG-83.7.10.5X	Sin TMX	1,11	85 ± 17	14,2
NG-83.7.10.7X	Sin TMX	1,08	170 ± 29 <sup>b</sup>	21,1
VECTORIZADOS CON FÓLICO				
NG-F-80.10.10.5X	Sin TMX	1,1	248 ± 56 <sup>a</sup>	66,6
NG-F-80.10.10.7X	Sin TMX	1,2	268 ± 72 <sup>a</sup>	70,7
NG-F-83.7.10.5X	Sin TMX	1,02	162 ± 14 <sup>b</sup>	74,5
NG-F-83.7.10.7X	Sin TMX	1,15	37 ± 9	77,3

*a:* Existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con NG-80.10.10.5X, NG-80.10.10.7X, NG-83.7.10.5X, NG-F-83.7.10.7X

*b:* Existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con NG-F-83.7.10.7X

Las partículas que presentaron por tanto un mayor tamaño fueron las micropartículas sintetizadas por la técnica de atomización y secado seguidas de los nanogeles, siendo las nanopartículas sintetizadas por la técnica de emulsión / evaporación las de menor diámetro obtenidas.





**Figura 47:** Fotografías de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de los nanogeles vectorizados con ácido fólico.

## **2.2.- CUANTIFICACIÓN DEL FÓLICO INCORPORADO EN LAS PARTÍCULAS VECTORIZADAS**

La evaluación del ácido fólico se realizó por la técnica de espectroscopia debido a que esta molécula presenta una absorbanza a una longitud de onda de  $\lambda = 360 \text{ nm}$  en DMSO.

### **A) Nanopartículas funcionalizadas sintetizadas por emulsión/evaporización**

Para poder vectorizar las partículas sintetizadas por emulsión/evaporización fue necesaria la síntesis previa del copolímero PLGA-PEG-FOL con la molécula vectora (ácido fólico). Se ha evaluado la cantidad de fólico que se ha incorporado al copolímero PLGA-PEG-FOL durante su síntesis, confirmándose que la reacción se ha llevado a cabo mol a mol, reaccionando un mol de PLGA-PEG con un mol del ácido fólico. El resultado final de la incorporación fue de  $111 \pm 43 \mu\text{g}$  de fólico / mg de copolímero PLGA-PEG-FOL.

A continuación se procedió a realizar la síntesis de los sistemas nanoparticulados por la técnica de emulsión/evaporación utilizando el copolímero ya funcionalizado. Se valoró la incorporación de folato por espectroscopia, obteniendo así la valoración de la funcionalización final de los sistemas. En las nanopartículas EF-LG50 la incorporación de fólico fue del 40,6% correspondiendo a  $22,5 \pm 2,51$   $\mu\text{g}$  de fólico / mg NP, mientras que en las partículas EF-LG50:LG75 y EF-LG50:L fue significativamente inferior, 4,3% y 5,5% respectivamente (Tabla 18).

**Tabla 18:** Cantidad de fólico incorporado en las nanopartículas sintetizadas por emulsión/evaporación ( $\mu\text{g}$  de Fólico/ mg NP) y el porcentaje al que equivale, así como la cuantificación del fólico incorporados en el copolímero PLGA-PEG-FOL ( $\mu\text{g}$  de Fólico/ mg de polímero).

SISTEMAS	$\mu\text{g}$ de Fólico/ mg NP	% Incorporado
EF-LG50	$22,5 \pm 2,5^a$	40,6
EF-LG50:LG75	$2,4 \pm 0,5$	4,3
EF-LG50:L	$3 \pm 0,5$	5,5
PLGA-PEG-FOL*	$111 \pm 43$	100

*a:* Diferencias estadísticamente significativas con EF-LG50:LG75 y EF-LG50:L ( $p < 0,05$ )

\*  $\mu\text{g}$  de Fólico/mg de polímero puesto que PLGA-PEG-FOL no es una partícula sino el copolímero sintetizado.

## B) Nanogeles funcionalizados sintetizados por polimerización radicalaria

La cantidad de fólico incorporado en los NG fue muy elevado encontrándose en todos los casos por encima del 40% (Tabla 19). Los sistemas que más fólico incorporaron fueron los que presentaban un mayor grado de entrecruzamiento (7%) (NG-F-80.10.10.7X y NG-F-83.7.10.7X) con un 68% y 62% de fólico respectivamente, lo que equivale a 209 y 192  $\mu\text{g}$  de Fólico/ mg NG respectivamente. Los otros dos sistemas restantes (NG-F-80.10.10.5X y NG-F-83.7.10.5X) presentaron una incorporación de 157,8 y 145,02  $\mu\text{g}$  de Fólico/ mg NG respectivamente lo que correspondió a un 50,8% y 44,4%.

**Tabla 19:** Cantidad de fólico incorporado en los nanogeles sintetizados por polimerización radicalaria ( $\mu\text{g}$  de Fólico/mg NG) y el porcentaje al que equivale (%).

SISTEMAS	$\mu\text{g}$ de Fólico/ mg NG	% incorporado
NG-F-80.10.10.5X	158	50,8
NG-F-80.10.10.7X	209	68,3
NG-F-83.7.10.5X	145	44,4
NG-F-83.7.10.7X	192	62,4

### **2.3.- ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (TGA)**

El comportamiento térmico-mecánico de las partículas poliméricas está directamente relacionado con las propiedades físico-químicas de los componentes (da Silva-Junior et al., 2009). Se ha realizado el estudio termogravimétrico de todas las síntesis con y sin fármaco, así como en los componentes (polímeros y monómeros) de las mismas por separado. Se ha observado una pérdida de masa en todas ellas en un intervalo de temperatura de 25°C a 600°C.

Con el fin de poder determinar la temperatura a la cual se produce la mayor pérdida de masa, se ha calculado la derivada de TGA, obteniendo las curvas derivadas termogravimétricas (DTG). Estas derivadas termogravimétricas ponen en manifiesto los picos de degradación (*Figuras 48, 49 y 50*) cuyos valores se han resumido en las *Tablas 20, 21 y 22*.

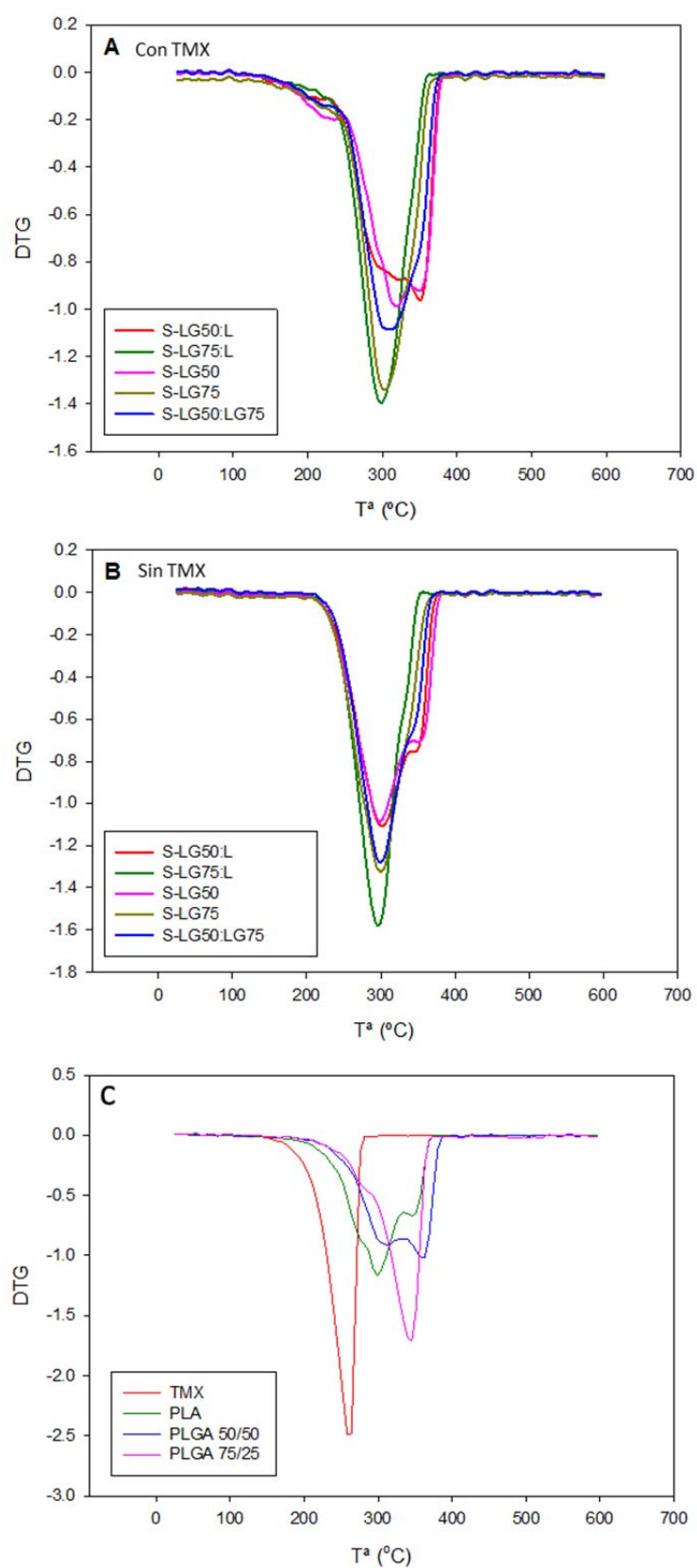
Gracias al análisis termogravimétrico se ha conseguido conocer el perfil térmico y la termoestabilidad de cada una de las partículas así como de los monómeros, copolímeros, polímeros, fármaco y ácido fólico utilizados en su síntesis (*Figura 48*).

A continuación se procede a exponer los resultados obtenidos por esta técnica de caracterización con cada uno de los sistemas.

#### **A.- TGA de las micropartículas sintetizadas por atomización y secado (spray dryer):**

Como se aprecia en la *Figura 48*, en todos los casos y en todas las partículas se observa una temperatura muy elevada a la cual se produce la mayor pérdida de masa, por encima de 250°C (*Tabla 20*), incluidas las partículas que incorporaron fármaco. La etapa de degradación se produce en un solo paso excepto en los sistemas cuya composición polimérica contenían el polímero PLGA50/50 (*Figura 48*). El componente más termosensible es el fármaco degradándose a 258°C, mientras que las partículas (con y sin fármaco) presentaron una estabilidad térmica por encima de los 299°C.





**Figura 48:** Gráficas de la degradación térmica de los sistemas basados en poliésteres alifáticos sintetizados por atomización y secado (spray dryer). A) Partículas con TMX, B) Partículas sin TMX, C) Polímeros de partida y fármaco.

**Tabla 20:** Datos de la degradación térmica de los sistemas basados en poliésteres alifáticos sintetizados por atomización y secado (spray dryer). (PM: pérdida de masa (%); T<sup>a</sup>: temperatura (°C)).

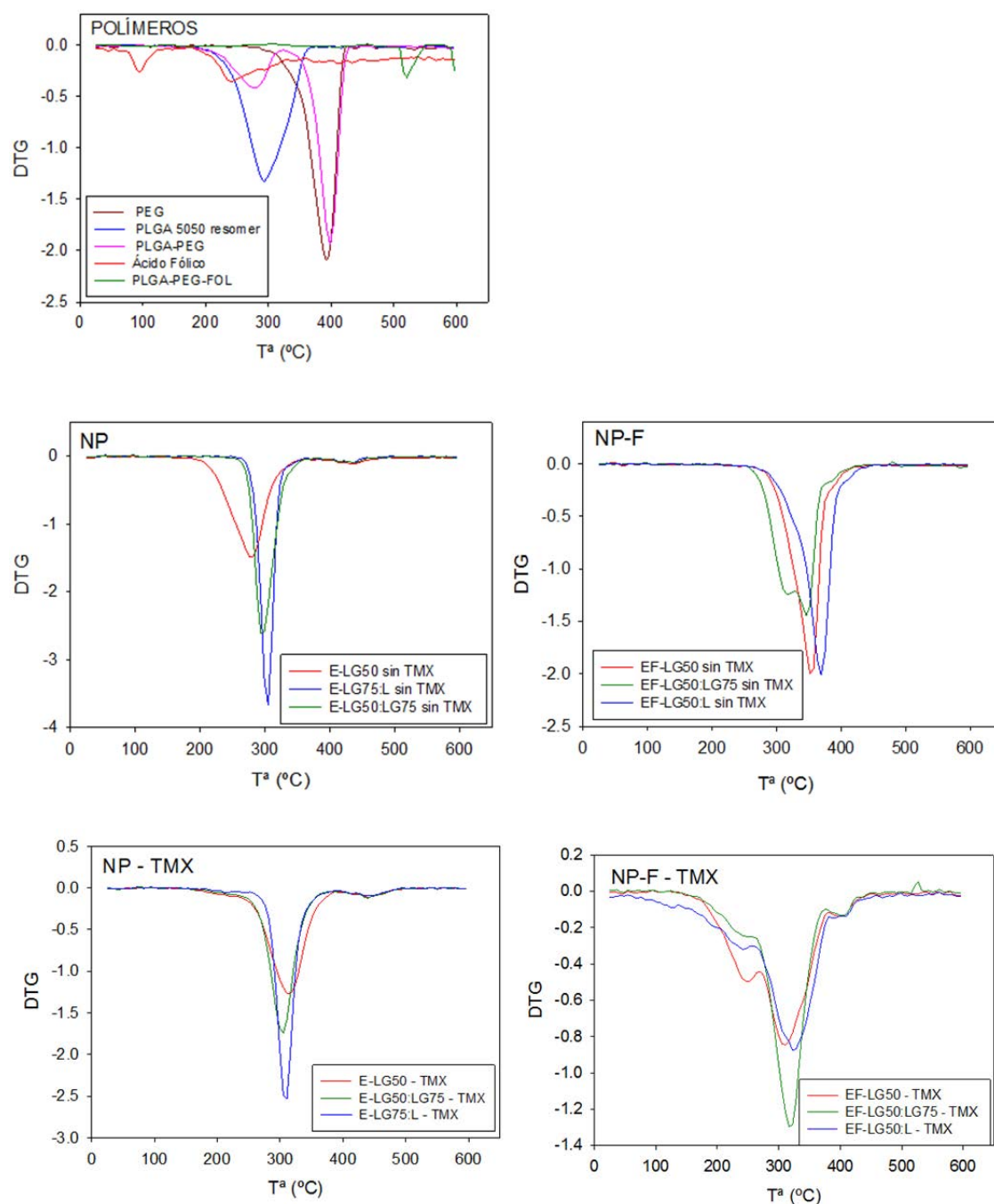
		1ª etapa			2ª etapa	
SPRAY DRIER		Tª (°C)	PM %		Tª (°C)	PM %
S-LG50	Con TMX	316,6	52,3		345,8	79,7
	Sin TMX	299,2	44,9		345,8	85,1
S-LG75	Con TMX	305	60,8			
	Sin TMX	299,2	54,7			
S-LG50:LG75	Con TMX	310,8	53,5			
	Sin TMX	299,2	44,5			
S-LG50:L	Con TMX	316,6	54,6		351,6	86,1
	Sin TMX	299,2	42,3		345,8	85,2
S-LG75:L	Con TMX	299,2	53,9			
	Sin TMX	299,2	60,2			
PLA		299,2	50,3		345,8	88,9
PLGA 75/25		345,8	77,3			
PLGA 50/50		310,8	39,2		357,5	81,3
TMX		258,3	68,9			

#### B.- TGA de las partículas sintetizadas por emulsión/evaporación.

Los materiales de partida, el PEG y el PLGA resomer®, presentan una única etapa de degradación (392,5 y 293,3°C respectivamente) sin embargo el copolímero sintetizado en el laboratorio PLGA-PEG presentó dos etapas de degradación (275 y 398°C) (Figura 49) confirmando la presencia de ambos compuestos en el copolímero. El ácido fólico mostró dos picos de degradación (95 y 240°C) teniendo una pérdida de masa muy pequeña 5,7 y 21% respectivamente. Los valores obtenidos a 95°C correspondían a una pérdida de masa tan pequeña que deja intuir que es debido a la presencia de agua en la muestra puesto que no es un ácido fólico anhidro.

Los sistemas nanoparticulados (NP) presentaron una estabilidad térmica por encima de los 200°C (Figura 49). Los sistemas sin vectorizar (NP) mostraron una única etapa de degradación cerca de los 300°C en todos los casos, excepto el E-LG50 sin TMX, que fue ligeramente inferior (275,8°C). Las nanopartículas vectorizas (NP-F) presentaron una o dos etapas y las partículas vectorizadas que contenían TMX presentaron tres etapas de degradación. Las NP-F sin fármaco presentaron los eventos térmicos por encima de los 300°C mientras que las NP-F con TMX mostraron una menor estabilidad con un primer evento térmico a 240°C y un bajo porcentaje de pérdida de masa (10 – 24%). Estas partículas fueron

las únicas que presentaron tres eventos térmicos, siendo los siguientes a 305 y 322°C con una pérdida de masa entre 53 y 66% respectivamente (Tabla 21).



**Figura 49:** Gráficas de la degradación térmica de los sistemas basados en poliésteres alifáticos sintetizados por emulsión/evaporación. NP: partículas sintetizadas por emulsión/evaporación, NP-F: partículas vectorizadas con fólico, NP-TMX: partículas con TMX incorporado, NP-F-TMX: partículas vectorizadas y con TMX incorporado. ● E-LG50; ● E-LG50:LG75; ● E-LG50:L

**Tabla 21:** Valores de degradación térmica de los sistemas basados en poliésteres alifáticos sintetizados por emulsión/evaporación.

EMULSIÓN		1ª etapa		2ª etapa		3ª etapa	
		Tª (°C)	PM %	Tª (°C)	PM %	Tª (°C)	PM %
E-LG50	Sin TMX	275,8	53,6	-	-	-	-
	Con TMX	316,6	56,2	-	-	-	-
E-LG50:LG75	Sin TMX	293,3	32,8	-	-	-	-
	Con TMX	305	50,7	-	-	-	-
E-LG75:L	Sin TMX	305	56,9	-	-	-	-
	Con TMX	310,8	53,8	-	-	-	-
EF-LG50	Sin TMX	351,6	59	-	-	-	-
	Con TMX	246,6	20,6	305	53,6	398	95,3
EF-LG50:LG75	Sin TMX	316,6	33,9	345,8	71,2	-	-
	Con TMX	240,8	10,2	316,6	54,5	398	93,1
EF-LG50:L	Sin TMX	369,1	64,6	-	-	-	-
	Con TMX	240,8	24,3	322,5	66,2	398	100
PLGA resomer®		293,3	49,2	-	-	-	-
PEG bisamina		392,5	67,6	-	-	-	-
Ácido Fólico		95	5,7	240,8	21	-	-
PLGA-PEG		275,8	17,6	398,3	92	-	-
PLGA-PEG-FOL		520	1			-	-
TMX		258,3	68,9	-	-	-	-

(PM: pérdida de masa %; Tª: temperatura °C).

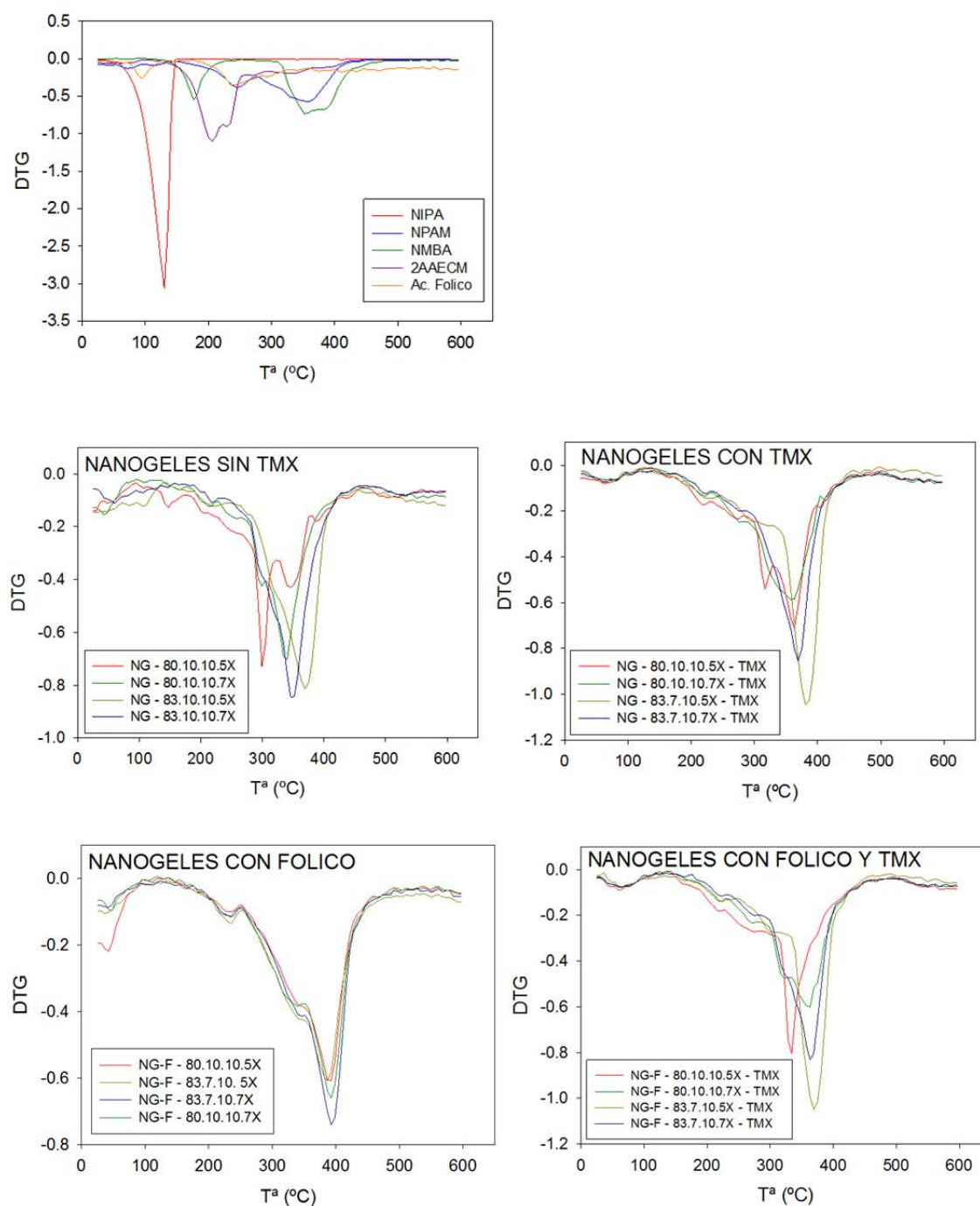
### C- TGA de los nanogeles sintetizados por polimerización radicalaria:

Primero se analizaron los monómeros comerciales y los sintetizados en el laboratorio. Los monómeros NPAM, y 2AAECM presentaron dos etapas de degradación térmica, el NIPA que mostró un único pico de degradación a 130°C y el NMBA con tres picos de degradación (Tabla 22 y Figura 50). El NIPA (comercial) fue el más termosensible produciéndose su mayor degradación a 130°C seguido del NMBA a 176,6°C (5% de pérdida la masa) y 351,6°C (37% de pérdida de masa). El 2AAECM tiene una pérdida de masa del 34% a 205°C. El NPAM y el ácido fólico presentan la misma degradación térmica a 240°C. El fármaco presentó una estabilidad a 258,3°C perdiendo el 68,9% como ya se ha comentado previamente. El NMBA y NPAM tuvieron una segunda etapa de degradación a la misma temperatura (351°C) con una pérdida de 37,3 y 66,2% respectivamente e incluso en NMBA presentó otro pico a 380,8°C menos marcado en el cual se produjo una pérdida final de masa del 57,8%.

En el caso de los NG ya sintetizados (*Figura 50*), presentaron uno, dos o tres etapas dependiendo de la composición. Los NG sin funcionalizar mostraron un evento térmico de degradación entre 299 - 369°C que en presencia del fármaco aumentó a 316 - 380,8°C. El sistema NG-80.10.10.5X demostró una segunda etapa de degradación térmica, tanto con TMX como sin él, a 363,3 y 340°C respectivamente. El NG-80.10.10.7X sin TMX también presentó un segundo evento térmico a 334,1°C. Los nanogeles vectorizados sin TMX fueron los únicos en los que se observó tres etapas. La primera entre 229,1 y 299°C, ligeramente inferior a sus homólogos sin fólico, lo que puede deberse a la presencia del fólico en la superficie. La segunda etapa se produce entre 334 - 340°C y la tercera a 386 - 392°C. Se detectó que esta última etapa de degradación puede deberse al monómero NMBA, ya que presenta la misma temperatura de degradación y que, además, las partículas con mayor porcentaje de entrecruzante (NMBA) en su composición, presentaron una mayor pérdida de masa en esta etapa. Las partículas funcionalizadas con TMX aumentaron la estabilidad térmica de los sistemas en un evento térmico entre 322 - 369°C.

**Tabla 22:** Datos de degradación térmica de los nanogeles (PM: pérdida de masa %; T<sup>a</sup>: temperatura °C).

POLIMERIZACIÓN			1ª etapa		2ª etapa		3ª etapa	
			T <sup>a</sup> (°C)	PM %	T <sup>a</sup> (°C)	PM %	T <sup>a</sup> (°C)	PM %
Nanogeles sin fólico	NG-80.10.10.5X	Sin TMX	299,2	38,7	340	56,4	-	-
		Con TMX	316,6	34,6	363,3	59,4	-	-
	NG-80.10.10.7X	Sin TMX	299,2	28,5	334,1	45,5	-	-
		Con TMX	357,5	51,7	-	-	-	-
	NG-83.7.10.5X	Sin TMX	369,2	67,7	-	-	-	-
		Con TMX	380,8	60,5	-	-	-	-
	NG-83.7.10.7X	Sin TMX	345,8	51,8	-	-	-	-
		Con TMX	369,1	57,6	-	-	-	-
Nanogeles con fólico	NG-F 80.10.10.5X	Sin TMX	229,1	12,2	340	33,5	386,7	54,7
		Con TMX	334,1	47,5	-	-	-	-
	NG-F 80.10.10.7X	Sin TMX	229,1	7,7	334,1	29,6	392,5	57,2
		Con TMX	322,5	33,7	357,5	51,7	-	-
	NG-F 83.7.10.5X	Sin TMX	235	11	340	35	386,7	58,1
		Con TMX	369,2	58,4	-	-	-	-
	NG-F 83.1.10.7X	Sin TMX	299,2	18	340	31,3	392,5	59
		Con TMX	363,3	54,9	-	-	-	-
Polímeros								
	NIPA		130	75,2	-		-	-
	NPAM		240,8	23,7	351,6	66,2	-	-
	NMBA		176,6	8,7	351,6	37,3	380,8	57,8
	2AAECM		205	34,7	223,3	51,8	-	-
	ACIDO FÓLICO		95	5,7	240,8	21	-	-
	TMX		258,3	68,9	-	-	-	-



**Figura 50:** Gráficas de la degradación térmica de los nanogeles sintetizados por polimerización — NG-80.10.10.5X — NG-80.10.10.7X — NG-83.7.10.5X — NG-83.7.10.7X

### 3.- CANTIDAD DE TAMOXIFENO INCORPORADO EN LOS SISTEMAS

#### A) Microesferas basadas en poliésteres alifáticos sintetizadas por atomización y secado:

Las eficiencias de incorporación fueron muy elevadas por esta técnica, encontrándose por encima del 94%, siendo inferior en aquellos sistemas que presentaban en su composición

poli (D,L-láctico) (*Tabla 23*). Estos sistemas incorporaron una media entre 36,6 y 48,9  $\mu\text{g}$  TMX/mg MS. La valoración de TMX en el interior de los sistemas se realizó después de la síntesis pero también después de la liberación observándose que la cantidad de fármaco remanente en el sistema después de la liberación fue muy baja en todos los casos.

**Tabla 23:** Cantidad de TMX incorporado en las microesferas basadas en poliésteres alifáticos sintetizadas por atomización y secado (*spray dryer*) y cantidad de fármaco remanente después de la liberación.

SISTEMA	TMX ( $\mu\text{g}$ TMX/mg MS)	EI (%)	TMX DESPUÉS DE LA LIBERACIÓN	
			( $\mu\text{g}$ TMX/mg MS)	%
S-LG50	47,6 $\pm$ 0,5	95 $\pm$ 1 <sup>a,b</sup>	0,12 $\pm$ 0,02	0,25 $\pm$ 0,03 <sup>c,b</sup>
S-LG75	48,9 $\pm$ 0,1	97,8 $\pm$ 0,1 <sup>a,b</sup>	0,23 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	0,49 $\pm$ 0,05 <sup>c,b</sup>
S-LG50:LG75	48,5 $\pm$ 1,4	97 $\pm$ 2 <sup>a,b</sup>	1,03 $\pm$ 0,44 <sup>c</sup>	2,13 $\pm$ 0,91
S-LG50:L	40,3 $\pm$ 1,1	77 $\pm$ 2	0,21 $\pm$ 0,02	0,53 $\pm$ 0,06 <sup>c</sup>
S-LG75:L	36,6 $\pm$ 0,1	69,6 $\pm$ 0,2	0,65 $\pm$ 0,11	1,77 $\pm$ 0,31

EI: eficiencia de incorporación (%).

a: Diferencias estadísticamente significativas con S-LG50:L ( $p < 0,05$ )

b: Diferencias estadísticamente significativas con S-LG75:L ( $p < 0,05$ )

c: Diferencias estadísticamente significativas con S-LG50:LG75 ( $p < 0,05$ )

El sistema que presentó una mayor eficiencia de incorporación fue S-LG75 seguido de S-LG50:LG75 > S-LG50 > S-LG50:L > S-LG75:L

## B) Nanopartículas basadas en poliésteres alifáticos sintetizadas por emulsión/evaporación:

En las partículas sintetizadas por la técnica de emulsión/evaporación previamente se realizó la puesta a punto de la técnica. Una de las variables que se estudió fue el porcentaje de fármaco añadido a la síntesis inicialmente. En la *Tabla 24* se puede apreciar que las eficiencias de incorporación fueron muy bajas cuando se partió de un 5% de TMX (23 – 35  $\mu\text{g}$  TMX/mg MS; EI = 44 – 62%) mientras que cuando se partió de un 20% TMX fueron más elevadas de lo normal, superando el 100% (312 – 372  $\mu\text{g}$  TMX/mg MS; EI = 121 – 146%). Estas eficiencias de incorporación tan elevadas no llegan a ser reales ya que se está cuantificando también el fármaco que ha quedado fuera de la partícula (*Figura 42*) y que no se ha llegado a incorporar. En el caso de las síntesis con un 10% de TMX inicial, las eficiencias de incorporación fueron muy buenas, por encima del 80%, obteniendo una incorporación bastante elevada de TMX (95 – 110  $\mu\text{g}$  TMX/mg MS; EI = 83 – 100,6%). Para el caso de los sistemas vectorizados con fólculo y 10% de TMX en el medio, se obtuvieron resultados similares con una eficiencia de

incorporación por encima del 85% (92 – 131  $\mu\text{g}$  TMX/mg MS; EI = 86 – 95%). Estos resultados nos llevaron a seleccionar el 10% del fármaco como una de las condiciones en la síntesis, despreciando el 5% por tener una eficiencia de incorporación baja y 20% por no ser capaz de encapsular todo el fármaco inicial, quedando parte de este TMX fuera de las partículas.

**Tabla 24:** Cantidad de TMX incorporado en las nanopartículas basadas de poliésteres alifáticos sintetizadas por emulsión/evaporación y cantidad de fármaco remanente después de la liberación.

SISTEMA	%TMX en la Síntesis	TMX ( $\mu\text{g}$ TMX/mg NP)	EI (%)	TMX DESPUÉS DE LA LIBERACIÓN	
				( $\mu\text{g}$ TMX/mg MS)	%
E- LG50	5%	35 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	62 $\pm$ 8	-	-
E-LG50:LG75		23 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	44 $\pm$ 4 <sup>f</sup>	-	-
E-LG75:L		26 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	45,2 $\pm$ 0,8 <sup>g</sup>	-	-
E- LG50	10%	95 $\pm$ 5 <sup>c</sup>	83 $\pm$ 4	7,6 $\pm$ 1,6	6,6 $\pm$ 1,4
E-LG50:LG75		110 $\pm$ 6	100,6 $\pm$ 5,5	6,7 $\pm$ 1,6	6,15 $\pm$ 1,5
E-LG75:L		97 $\pm$ 2	88 $\pm$ 2	4,5 $\pm$ 0,5	4,1 $\pm$ 0,4
E- LG50	20%	372 $\pm$ 69	146 $\pm$ 27 <sup>h</sup>	-	-
E-LG50:LG75		327 $\pm$ 52	139 $\pm$ 22 <sup>i</sup>	-	-
E-LG75:L		312 $\pm$ 53	121 $\pm$ 20 <sup>k</sup>	-	-
EF-LG50	Vectorizado con fólico + 10% TMX	105 $\pm$ 8	91 $\pm$ 7	4,6 $\pm$ 0,4	4,2 $\pm$ 0,4
EF-LG50:LG75		92 $\pm$ 1 <sup>d</sup>	86 $\pm$ 1	6,2 $\pm$ 1,9	5,8 $\pm$ 1,8
EF-LG50:L		131 $\pm$ 3 <sup>e</sup>	95 $\pm$ 3	5,4 $\pm$ 0,6	4,8 $\pm$ 0,6

EI: Eficiencia de incorporación (%).

a: Diferencias estadísticamente significativas con todo el resto de partículas excepto con el sistema E-LG75:L 5% TMX ( $p < 0,05$ )

b: Diferencias estadísticamente significativas con todo el resto de partículas excepto con el sistema E-LG50:LG75 y E- LG50 5% TMX ( $p < 0,05$ )

c: Diferencias estadísticamente significativas con el sistema E-LG50:LG75 10%TMX y EF-LG75:L 10% TMX ( $p < 0,05$ )

d: Diferencias estadísticamente significativas con el E-LG50:LG75 10%TMX ( $p < 0,05$ )

e: Diferencias estadísticamente significativas con todo el resto de sistemas ( $p < 0,05$ )

f: Diferencias estadísticamente significativas con todo el resto de sistemas excepto con los sistemas que incorporaron 5% de TMX ( $p < 0,05$ )

g: Diferencias estadísticamente significativas con todo el resto de sistemas excepto con los sistemas que incorporaron 5% de TMX y el sistema E- LG50 10%TMX ( $p < 0,05$ )

h: Diferencias estadísticamente significativas con todo el resto de sistemas excepto con los sistemas que incorporaron 20% de TMX ( $p < 0,05$ )

i: Diferencias estadísticamente significativas con todo el resto de sistemas excepto con los sistemas que incorporaron 5% de TMX y el sistema E-LG50:LG75 10%TMX ( $p < 0,05$ )

k: Diferencias estadísticamente significativas con los sistemas que incorporaron 5% TMX ( $p < 0,05$ )

No existieron diferencias significativas en las eficiencias de incorporación entre los sistemas sintetizados bajo las mismas condiciones



Después del ensayo de liberación con los sistemas preparados a partir de 10% de TMX, se evaluó la cantidad de fármaco remanente en ellos. Como resultado se obtuvo que la mayoría del fármaco había sido liberado puesto que la cantidad remanente en los sistemas fue inferior al 7%.

Descartando las síntesis con un 5% y un 20% de TMX el orden de eficiencias de incorporación fue el siguiente: E-LG50:LG75 > EF-LG75:L > EF-LG50 > E-LG75:L > EF-LG50:LG75 > E-LG50.

### C) Nanogeles poliméricos sintetizadas por polimerización radicalaria:

Las eficiencias de incorporación en estos sistemas fueron muy elevadas, comprendiéndose entre 79 - 100%, lo que equivale a 39 - 50  $\mu\text{g}$  TMX/mg NG. En el caso de los sistemas vectorizados, la incorporación fue ligeramente superior 50  $\mu\text{g}$  TMX/mg NG siendo del 100% (Tabla 25). El sistema que tuvo una menor eficiencia fue NG-80.10.10.5x ( $39 \pm 7$   $\mu\text{g}$  TMX/mg NG -  $79 \pm 13$  %).

**Tabla 25:** Cantidad de TMX incorporado en los nanogeles sintetizados por polimerización radicalaria ( $\mu\text{g}$  TMX/mg NG) y las Eficiencias de Incorporación (EI)(%).

SISTEMA	TMX ( $\mu\text{g}$ TMX/mg NG)	EI (%)
<b>Nanogeles</b>		
NG-80.10.10.5x	$39 \pm 7$	$79 \pm 13$
NG-80.10.10.7x	$49 \pm 5$	$99 \pm 9$
NG-83.7.10.5x	$50 \pm 0,4$	$100,3 \pm 0,7$
NG-83.7.10.7x	$47 \pm 3$	$95 \pm 7$
<b>Nanogeles vectorizados con Fólico</b>		
NG-F-80.10.10.5x	$50 \pm 5$	$101 \pm 9$
NG-F-80.10.10.7x	$50 \pm 2$	$100 \pm 5$
NG-F-83.7.10.5x	$50 \pm 3$	$100 \pm 5$
NG-F-83.7.10.7x	$50 \pm 0,8$	$100 \pm 1$

No hay diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ )

#### 4.- LIBERACIÓN DEL FÁRMACO DESDE LOS SISTEMAS

Hay que tener en cuenta que los ensayos llevados a cabo *in vitro* para la liberación del fármaco son en presencia de SDS (dodecil sulfato sódico). El SDS es un tensioactivo que potencia la salida del fármaco de los sistemas e incrementa la solubilidad del fármaco lo que favorece la cuantificación del mismo en el ensayo. Sin la presencia de este tensioactivo, la liberación del fármaco hubiera sido mucho más lenta (Martínez et al., 2013), lo que puede observarse *in vitro* ya que en condiciones fisiológicas esta sustancia no se encuentra.

##### **A) Microesferas basadas en poliésteres alifáticos sintetizadas por atomización y secado (spray dryer):**

Las microesferas sintetizadas por atomización y secado (spray dryer) presentaron distintos perfiles de liberación en función de la composición copolimérica (*Figura 51*). De esta manera las partículas S-LG50:L-TMX y las S-LG50-TMX mostraron las liberaciones más rápidas alcanzando el máximo de liberación a los 11 y 14 días. Los sistemas con una liberación más lenta fueron S-LG75-TMX y S-LG75:L-TMX tardando en alcanzar el máximo de liberación a los 54 y 58 días respectivamente. Así mismo, los sistemas que más cantidad de TMX liberaron fueron los que incorporaron poli (D,L-láctico) es su estructura S-LG50:L-TMX y S-LG75:L-TMX llegando a liberar el 99 y 98% de lo incorporado, mientras que las partículas S-LG50:LG75-TMX liberaron 90% (*Tabla 26*).

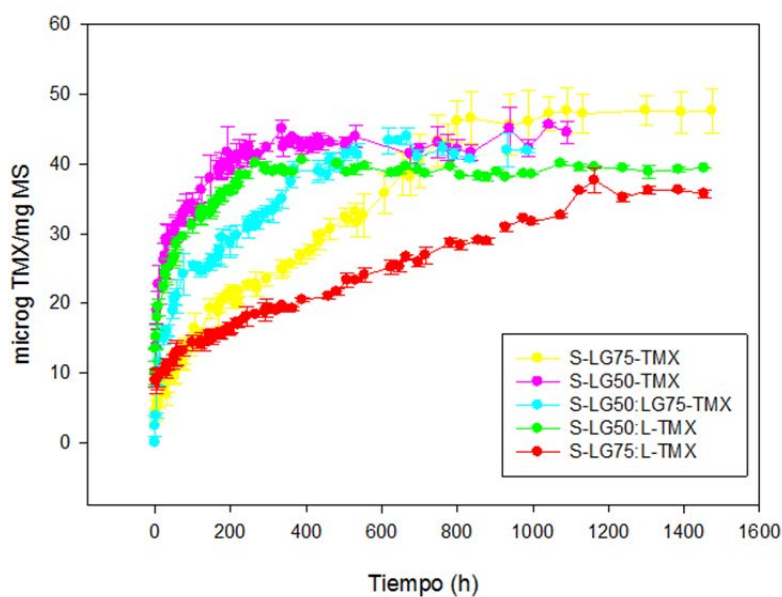
**Tabla 26:** Cantidad máxima de fármaco liberado ( $\mu\text{g}$  TMX/mg MS), porcentaje al que corresponde y el tiempo máximo de la liberación en horas y días.

MICROESFERAS	TMX ( $\mu\text{g}$ TMX/mg MS)	% DE TAMOXIFENO LIBERADO	HORAS	DIAS
S-LG50	$45 \pm 1,2$	$94,6 \pm 2,5$	336	14
S-LG75	$48,9 \pm 0,05^b$	$97,4 \pm 4,3$	1299	54
S-LG50:LG75	$43,9 \pm 1,2$	$90,6 \pm 2,5^a$	667	28
S-LG50:L	$40,1 \pm 0,2^c$	$99,6 \pm 0,6$	266	11
S-LG75:L	$37,6 \pm 1,7^c$	$98,7 \pm 0,3$	1385	58

a: Diferencias estadísticamente significativas con S-LG50:L, S-LG75:L ( $p < 0,05$ )

b: Diferencias estadísticamente significativas con todos los demás sistemas ( $p < 0,05$ )

c: Diferencias estadísticamente significativas con S-LG50, S-LG75, S-LG50:LG75 ( $p < 0,05$ )



**Figura 51:** Cantidad de TMX acumulado en la liberación de las microesferas sintetizadas por atomización y secado (spray dryer).

#### **B) Nanopartículas basadas en poliésteres alifáticos sintetizadas por emulsión/evaporización:**

La liberación del fármaco desde las nanopartículas sintetizadas por emulsión sin vectorizar y cargadas a partir de un 5% de TMX (*Figura 52 A*) alcanzó valores comprendidos entre  $23 \pm 1$  y  $35 \pm 2$   $\mu\text{g}$  TMX/mg NP entre las 9 y 25 horas. Las NP E-LG50:LG75 y E-LG75:L alcanzaron la concentración máxima en el mismo tiempo (25 horas). No hay diferencias significativas entre estos tres sistemas (5% TMX), pero sí que presentaron diferencias significativas con los sistemas sintetizados en otras condiciones (10% TMX y las NP vectorizadas). El sistema E-LG50, las NP más hidrofílicas de las tres síntesis, son las que más TMX liberan y es el sistema que más se diferencia de los tres, tanto en cantidad liberada como en tiempo ( $35 \pm 2$   $\mu\text{g}$  TMX/mg NP en 9h.).

En el caso de las nanopartículas sin vectorizar y cargadas a partir de un 10% de TMX (*Figura 52 B*) alcanzaron valores superiores de concentración máxima liberada (entre 95 y 110  $\mu\text{g}$  TMX/mg NP) en 3,3 días. Las nanopartículas vectorizadas y cargadas a partir de un 10% de TMX (*Figura 52 C*) alcanzaron concentraciones de 92 – 132  $\mu\text{g}$  TMX/mg NP entre 0,3 y 2 días. Cuando la cantidad de fármaco incorporado en la partícula aumenta (*Tabla 24*) se observa un aumento del tiempo de liberación y de la concentración máxima liberada. Los tres sistemas sin funcionalizar (cargados a partir de 10% de TMX) presentan el mismo tiempo máximo de

liberación (79 horas), pero aumentado comparado con los mismos sistemas cargados a partir de 5% TMX (9 - 25h), puesto que es mayor la cantidad de TMX a liberar. De los sistemas cargados a partir de 10% TMX (*Figura 52 B*), el sistema E-LG50:LG75 es el que libera una mayor cantidad  $110 \pm 8 \mu\text{g TMX/mg NP}$ ; sin embargo, a tiempos cortos, el sistema E-LG75:L libera más rápidamente. En este caso tampoco se detecta diferencias significativas entre los tres sistemas sintetizados en las mismas condiciones.

Cuando las partículas se funcionalizaron con fólico, el comportamiento de liberación se vio modificado (*Figura 52 C*). Las diferencias entre estos sistemas vectorizados son mayores, ya que todos ellos presentan distintos valores de concentración máxima alcanzada a distintos tiempos (9, 23 y 48h). En este caso el sistema EF-LG50:L (más hidrofóbico) presenta diferencias significativas los otros dos sistemas más hidrofílicos sintetizados en las mismas condiciones, siendo el sistema que más libera ( $132 \mu\text{g TMX/mg NP}$ ).

Si comparamos las tres gráficas (*Figura 52 A, B y C*) y profundizamos un poco más en los resultados se observa que hay diferencias significativas en los resultados de liberación entre cada condición de síntesis (*Tabla 27*), sin embargo en todos los casos se consiguió una liberación del 100%.

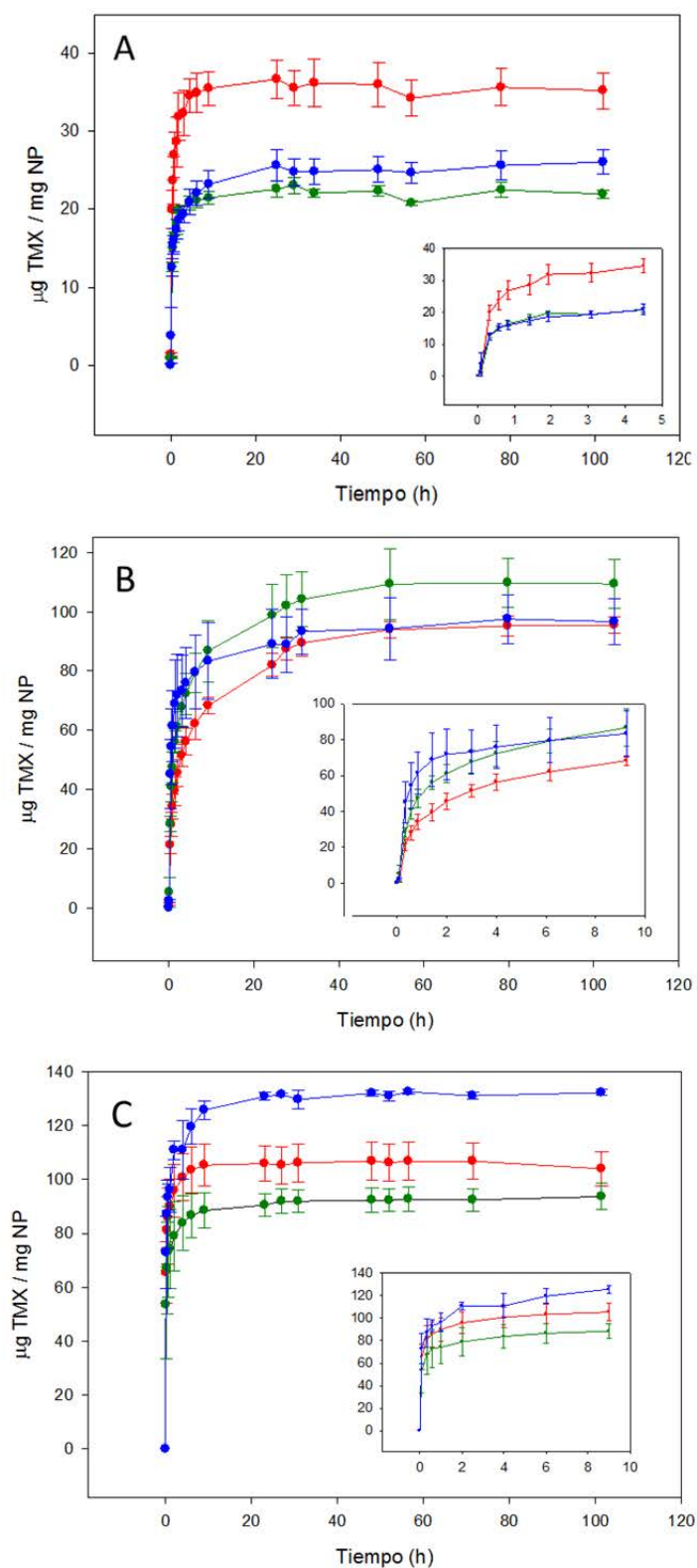
**Tabla 27:** Cantidad máxima ( $\mu\text{g TMX/mg NP}$ ) de fármaco liberado desde las nanopartículas preparadas por emulsión/evaporación, porcentaje al que equivale y el tiempo máximo de la liberación en horas y días.

NANOPARTÍCULAS	% DE TMX LIBERADO	µg TMX/mg NP	Tiempo de máxima liberación	
			HORAS	DÍAS
Preparadas a partir de 5% TMX <sup>a</sup>				
E-LG50 5% TMX	100 ± 6	35 ± 2	9	0,3
E-LG50:LG75 5% TMX	100 ± 4	23 ± 1	25	1
E-LG75:L 5% TMX	99 ± 8	26 ± 2	25	1
Preparadas a partir de 10% TMX				
E-LG50 10% TMX	100 ± 4	95 ± 3	79	3,3
E-LG50:LG75 10% TMX	100 ± 7	110 ± 8 <sup>c</sup>	79	3,3
E-LG75:L 10% TMX	100 ± 8	97 ± 8	79	3,3
Preparadas a partir de 10% TMX y vectorizadas con fólico				
EF - LG50 10% TMX	100 ± 7	105 ± 8 <sup>c</sup>	9	0,3
EF - LG50:LG75 10% TMX	100 ± 5	92 ± 5	27	1,1
EF - LG50:L 10% TMX	100,3 ± 0,81	132 ± 1 <sup>b</sup>	48	2

a: Diferencias estadísticamente significativas con el resto de partículas sintetizadas en otras condiciones ( $p < 0,05$ )

b: Diferencias estadísticamente significativas con el resto de partículas ( $p < 0,05$ )

c: Diferencias estadísticamente significativas con el sistema EF - LG50:LG75 10% TMX ( $p < 0,05$ )



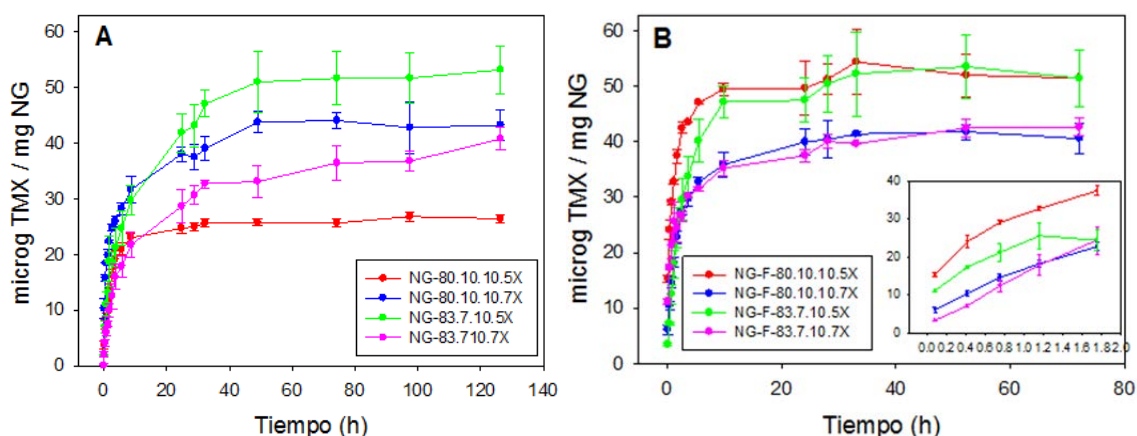
**Figura 52:** Cantidad de TMX liberado desde las nanopartículas sintetizadas por emulsión/evaporación. **A)** Nanopartículas sin vectorizar sintetizadas con 5% TMX; **B)** Nanopartículas sin vectorizar sintetizadas con 10% TMX (● E-LG50-TMX, ● E-LG50:LG75-TMX, ● E-LG75:L-TMX); **C)** Nanopartículas vectorizadas con fóllico y sintetizadas con 10% de TMX (● EF-LG50-TMX, ● EF-LG50:LG75-TMX, ● EF-LG50:L-TMX). (Inserto con las primeras horas de liberación).

### C) Nanogeles poliméricos sintetizadas por polimerización radicalaria:

Los nanogeles, como sistemas de liberación controlada, han liberado entre el 65 y 100% del TMX incorporado entre 1,3 y 5,2 días (*Figura 53*). Los sistemas más rápidos tardaron un día o dos en liberar el TMX incorporado y fueron los NG cuya composición contenía 80% de NIPA, 10% de NPAM y 10% 2AAECM, (NG 80.10.10.5x y NG 80.10.10.7X) tanto vectorizadas (*Figura 53 B*) como sin vectorizar (*Figura 53 A*). Los NG que controlaron más la liberación y por lo tanto tardaron más, fueron aquellos cuya composición contenía 83% NIPA, 7% NPAM, 10% 2AAECM con 7% de entrecruzamiento, tanto vectorizados como sin vectorizar, liberando el 81% y 86% del TMX en 2,2 y 5,2 días respectivamente (*Tabla 28*).

En la *Figura 53 A*, se observa que el nanogel NG-80.10.10.5X sin funcionalizar, a pesar de que presenta un menor porcentaje de entrecruzante, gráficamente se observa que es el sistema que libera una menor cantidad de TMX, por debajo del NG-80.10.10.7X. Esto es debido a que este sistema (NG-80.10.10.5X) es el que menos TMX incorporó  $39 \pm 7 \mu\text{g TMX/mg NP}$  (79%) frente al sistema NG-83.7.10.5X que incorporó  $50 \pm 0,4 \mu\text{g TMX/mg NP}$  (100%) (*Tabla 25*).

En la *Figura 53 B* se observa que los sistemas funcionalizados que más liberan son los que tienen una menor proporción de NIPA (80%) (NG-80.10.10.5x y NG-80.10.10.5x) liberando en 33 horas frente a los nanogeles con un 83% de NIPA que tardaron 52 horas. En estos sistemas el mayor grado de entrecruzamiento (7%) produjo una liberación del 80% frente al 100% liberado por los sistemas con un 5% de entrecruzamiento.



**Figura 53:** Cantidad de TMX liberados desde los nanogeles sintetizados por polimerización radicalaria. **A)** Nanogeles sin vectorizar (● NG-80.10.10.5X, ● NG-80.10.10.7X, ● NG-83.7.10.5X, ● NG-83.7.10.7X); **B)** Nanogeles vectorizados con ácido fólico (● NG-F-80.10.10.5X, ● NG-F-80.10.10.7X, ● NG-F-83.7.10.5X, ● NG-F-83.7.10.7X). Inserto con las primeras horas de liberación.

**Tabla 28:** Porcentaje máximo y cantidad máxima ( $\mu\text{g TMX/mg NG}$ ) de fármaco liberado y el tiempo máximo de la liberación en horas y días.

NANOGELES	% DE TAMOXIFENO LIBERADO	$\mu\text{g TMX/mg NG}$	HORAS	DÍAS
<b>SIN VECTORIZAR</b>				
NG-80.10.10.5x	$65 \pm 2^a$	$26 \pm 0,7^a$	32	1,3
NG-80.10.10.7x	$88 \pm 2$	$44 \pm 2$	49	2
NG-83.7.10.5x	$102 \pm 7^c$	$52 \pm 5$	74	3,1
NG-83.7.10.7x	$86 \pm 4$	$41 \pm 2^b$	126	5,2
<b>VECTORIZADOS CON FÓLICO</b>				
NG-F-80.10.10.5x	$100 \pm 7$	$54 \pm 6$	33	1,4
NG-F-80.10.10.7x	$82 \pm 0,4^b$	$41 \pm 0,3^d$	33	1,4
NG-F-83.7.10.5x	$98 \pm 7$	$53 \pm 6$	52	2,2
NG-F-83.7.10.7x	$81 \pm 2^b$	$42 \pm 2^d$	52	2,2

*a: diferencias estadísticamente significativas con todos los demás sistemas ( $p < 0,05$ )*

*b: diferencias estadísticamente significativas con todos aquellos sistemas con 5% de entrecruzamiento (NG-80.10.10.5x; NG-83.7.10.5x; NG-F-80.10.10.5x; NG-F-83.7.10.5x) ( $p < 0,05$ )*

*c: diferencias estadísticamente significativas con NG-83.7.10.7x ( $p < 0,05$ )*

*d: diferencias estadísticamente significativas con todos aquellos sistemas con 5% de entrecruzamiento y funcionalizadas (NG-F-80.10.10.5x; NG-F-83.7.10.5x) ( $p < 0,05$ ).*

#### 4.1.- VELOCIDADES DE LIBERACIÓN

Se ha realizado un estudio en todas las cinéticas de liberación obtenidas de los ensayos de liberación, con la finalidad de determinar la velocidad de liberación con la que los sistemas controlan la salida del fármaco. En muchos de los casos se ha podido establecer distintas etapas, diferenciándolas por la velocidad de liberación. Ha de tenerse en cuenta que todos los estudios “*in vitro*” realizados sobre la liberación del TMX desde los sistemas, se hicieron en presencia de un 0,5% de SDS (dodecil sulfato sódico). Este tensioactivo en el medio favorece la solubilidad del fármaco hidrofóbico y con ello su liberación desde las micro/nanosistemas.

##### A) MICROESFERAS SINTETIZADAS POR ATOMIZACIÓN Y SECADO (SPRAY DRYER):

En las microesferas sintetizadas por atomización y secado (spray dryer) se han concretado y definido varias velocidades dentro de una misma cinética, pudiendo distinguir dos e incluso tres etapas claras en todas ellas. Se aprecian tres etapas en las partículas cuya composición polimérica fue S-LG50:LG75 y S-LG50:L, en los restantes sistemas se aprecian solo dos etapas.

En la etapa inicial (1ª etapa) la velocidad de liberación es claramente superior en todos los casos a la etapa 2ª, y ésta es superior a la 3ª etapa, lo que indica que según avanza el tiempo se ralentiza la liberación.

La velocidad a la que se empezó a liberar el tamoxifeno en el caso de las partículas S-LG50 fue de 73,36  $\mu\text{g TMX} / \text{h}$  durante las 9 h iniciales (*Tabla 29*). De las 24 h a las 336 h, cuando se cumple la máxima liberación, la velocidad disminuye hasta 1,68  $\mu\text{g TMX} / \text{h}$ . En la cinética de las microesferas S-LG75, su fase inicial se ve aumentada hasta las 200 h alcanzando una velocidad de 2,61  $\mu\text{g TMX} / \text{h}$ , visiblemente inferior a la alcanzada por el sistema S-LG50, ya que al ser más hidrófobo su degradación se ven ralentizados. Las microesferas S-LG50:LG75 tienen tres etapas, la primera mantiene el intervalo de tiempo de S-LG50 hasta las 9 h y su velocidad se ve reducida a casi la mitad, 36,66  $\mu\text{g TMX} / \text{h}$ ; en la segunda etapa la velocidad disminuye a 4,31  $\mu\text{g TMX} / \text{h}$  en un intervalo de tiempo que va desde las 24 h hasta las 103 h; la última etapa llega hasta las 667 h de liberación a una velocidad todavía más lenta, 1,15  $\mu\text{g TMX} / \text{h}$ . El sistema S-LG50:L presenta una primera etapa de liberación a 28,93  $\mu\text{g TMX} / \text{h}$  durante las primeras 9 horas, ralentizando la velocidad comprado con el sistema S-LG50 por la presencia PLA. Este sistema presenta dos etapas a la misma velocidad que el sistema S-LG50:LG75 pero en menor tiempo puesto que la proporción de PLGA50:50 (polímero más hidrofílico) es mayor. El sistema más hidrofóbico S-LG75:L es el que presentó la menor velocidad de liberación (0,87  $\mu\text{g TMX} / \text{h}$ ) durante el periodo de tiempo más largo 390 h. La segunda etapa presento una velocidad todavía inferior 0,52  $\mu\text{g TMX} / \text{h}$  hasta las 1306 h. Este sistema es el que presento las etapas de liberación más largas, como se esperaba, puesto que la liberación fue la más prolongada en el tiempo debida a la hidrofobicidad del sistema.

**Tabla 29:** Velocidades de liberación alcanzadas por los distintos sistemas sintetizados por atomización y secado (*spray dryer*) en las distintas etapas de liberación.

SISTEMA	1ª ETAPA			2ª ETAPA			3ª ETAPA		
	T (h)	K	$r^2$	T (h)	K	$r^2$	T (h)	K	$r^2$
S-LG50	0 - 9	73,36	0,90	24 - 336	1,68	0,91	-	-	-
S-LG75	0 - 200	2,61	0,94	216 - 836	1,24	0,99	-	-	-
S-LG50:LG75	0 - 9	36,66	0,95	24 - 103	4,31	0,94	120 - 667	1,15	0,96
S-LG50:L	0 - 9	28,93	0,91	9 - 54	4,56	0,92	57 - 266	1,59	0,97
S-LG75:L	0 - 390	0,87	0,95	459 - 1306	0,52	0,98	-	-	-

K: velocidad de liberación ( $\mu\text{g TMX} / \text{h}$ ); T: intervalo de tiempo durante se mantienen la velocidad (h);  $r^2$ : coeficiente de correlación.



**B) NANOPARTÍCULAS SINTETIZADAS POR EMULSIÓN/EVAPORACIÓN:**

Las NP presentaron tres etapas de velocidades distintas e incluso 4 en algunos casos como en las síntesis con 10% de TMX (Tabla 30). Las velocidades de liberación se correlacionan con las cinéticas de liberación observadas. En todos los casos las primeras etapas presentaron una liberación mucho más rápida que se va ralentizando a medida que pasa el tiempo. Así mismo se observa que los intervalos de tiempo de cada etapa son similares entre las partículas excepto en las partículas funcionalizadas. Esto demuestra una vez más, como la composición del sistema afecta a su comportamiento. En las tres partículas con 5% TMX se observa que en la primera etapa presentan velocidades de liberación diferentes y que disminuyen a medida que aumenta la hidrofobicidad en la partícula (45,06; 28,54; 26,84  $\mu\text{g TMX / h}$  para E-LG50; E-LG50:LG75; E-LG75:L respectivamente).

Para las partículas con 10% TMX vemos que presentan una velocidad de liberación superior a las partículas con 5% TMX. Los periodos de liberación observados son similares pero en este caso hay una cuarta etapa alcanzando las 31 horas de liberación. Destaca en la primera etapa que el sistema E-LG75:L presentó una liberación más rápida (79,43  $\mu\text{g TMX / h}$ ) para ser la menos rápida después (2,15  $\mu\text{g TMX / h}$  en la tercera etapa) por su hidrofobicidad. En la segunda etapa las velocidades son iguales entre E-LG50:LG75 y E-LG75:L (9,06 y 9,02  $\mu\text{g TMX / h}$  respectivamente). A partir de esta segunda etapa hasta el final de la liberación el sistema más rápido fue el más hidrófilo (E-LG50).

Los sistemas funcionalizados con fólico no obtuvieron una buena correlación durante la primera etapa, lo que puede ser debido a una rápida liberación del fármaco en los primeros 20 minutos (0,33h). Esto puede deberse debido a un posible efecto Burst. Al igual que en los sistemas sin funcionalizar y con 10% TMX, el sistema que presentó una mayor velocidad de liberación inicialmente fue EF-LG50:L (13,58  $\mu\text{g TMX / h}$ ), seguido de EF-LG50 con 8,2  $\mu\text{g TMX / h}$  y EF-LG50:LG75 (3,03  $\mu\text{g TMX / h}$ ). Esta tendencia se mantiene en las etapas posteriores. A medida que pasa el tiempo se observa una disminución en la velocidad de liberación.

**Tabla 30:** Velocidades de liberación alcanzadas por los distintos sistemas sintetizados por emulsión/evaporación en las distintas etapas de liberación.

	FORMULACIÓN	1ª ETAPA			2ª ETAPA			3ª ETAPA			4ª ETAPA		
		T (h)	K	r <sup>2</sup>	T (h)	K	r <sup>2</sup>	T (h)	K	r <sup>2</sup>	T (h)	K	r <sup>2</sup>
5% TMX	E- LG50	0 - 0,53	45,06	0,92	0,53 - 2	5,53	0,94	2 - 6	0,8	0,89	-	-	-
	E-LG50:LG75	0 - 0,53	28,54	0,92	0,53 - 2	3,5	0,99	2 - 29	0,11	0,86	-	-	-
	E-LG50:L	0 - 0,53	26,84	0,94	0,53 - 2	2,38	0,999	2 - 9	0,6	0,96	-	-	-
10% TMX	E- LG50	0 - 0,58	53,23	0,95	0,58 - 2	11,5	0,97	2 - 6	3,87	0,96	6-31	1,06	0,99
	E-LG50:LG75	0 - 0,83	59,42	0,95	0,83 - 3	9,06	0,96	3 - 6	3,61	0,99	6-31	0,93	0,97
	E-LG75:L	0 - 0,83	79,43	0,88	0,83 - 2	9,02	0,94	1,5 - 6	2,15	0,97	6-31	0,46	0,94
Vectorización con Fólito + 10% TMX	EF-LG50	0 - 0,33	-	-	0,33 - 2	8,2	0,94	2- 9	1,3	0,9	-	-	-
	EF-LG50:LG75	0 - 0,33	-	-	0,33 - 6	3,03	0,88	6 - 27	0,22	0,94	-	-	-
	EF-LG50:L	0 - 0,33	43,57	0,87	0,33 - 2	13,58	0,98	2 - 9	2,3	0,92	-	-	-

*K: velocidad de liberación  $\mu\text{g TMX} / \text{h}$ ; T: intervalo de tiempo durante se mantienen la velocidad;  $r^2$ : coeficiente de correlación*

### C) NANOGELES SINTETIZADOS POR POLIMERIZACIÓN RADICALARIA:

Los nanogeles presentaron tres etapas claras de liberación, siendo la primera de ellas la más rápida para ir decreciendo la velocidad a medida que pasa el tiempo, como ya se ha observado en los anteriores sistemas. Los resultados sobre los nanogeles vectorizados son iguales que en los nanosistemas, incrementan la velocidad con respecto a sus equivalentes no funcionalizados (Tabla 31).

Los sistemas que presentaron una mayor velocidad de liberación fueron los NG-F-83.7.10.7X y NG-F-83.7.10.5X mientras que los sistemas más lentos fueron NG 80.10.10.5X y los NG 83.7.10.7X. Sin embargo los sistemas funcionalizados presentaron una mayor velocidad que sus homólogos sin funcionalizar. Dentro de estos sistemas funcionalizados el orden de velocidades sería el siguiente NG-F-83.7.10.7X > NG-F-80.10.10.5X > NG-F-83.7.10.5X > NG-F-80.10.10.7X.

**Tabla 31:** Velocidades de liberación alcanzadas por los distintos nanogeles sintetizados por polimerización en las distintas etapas de liberación.

	FORMULACIÓN	1ª ETAPA			2ª ETAPA			3ª ETAPA		
		T (h)	K	r <sup>2</sup>	T (h)	K	r <sup>2</sup>	T (h)	K	r <sup>2</sup>
Sin vectorizar	NG-80.10.10.5x	0 - 3,6	4,7	0,91	3,6 - 8,6	0,76	0,99	8,6 - 32	0,11	0,99
	NG-80.10.10.7x	0,08 - 1,6	6,6	0,88	1,7 - 8,6	1,45	0,93	8 - 49	0,29	0,97
	NG-83.7.10.5x	0 - 1,6	10,2	0,95	1,6 - 24	1	0,95	24 - 49	0,37	0,91
	NG-83.7.10.7x	0 - 8,6	2,4	0,89	8,6 - 32	0,45	0,99	32 - 126	0,08	0,95
Vectorizadas con fólculo	NG-F-80.10.10.5x	0,08 - 2,5	10,07	0,92	2,5 - 9,8	0,97	0,92	24 - 33	0,53	0,98
	NG-F-80.10.10.7x	0,08 - 2,5	8,4	0,97	2,5 - 9,8	1,12	0,94	9,8 - 33	0,24	0,98
	NG-F-83.7.10.5x	0 - 2,5	11,5	0,96	2,5 - 9,8	2,35	0,95	24 - 33	0,52	0,95
	NG-F-83.7.10.7x	0,08 - 1,16	18,8	0,83	1,7 - 5,5	1,91	0,89	5,5 - 33	0,33	0,97

K: velocidad de liberación ( $\mu\text{g TMX} / \text{h}$ ); T: intervalo de tiempo durante se mantienen la velocidad (horas); r<sup>2</sup>: coeficiente de correlación.

Comparando todos y cada uno de los sistemas en la primera etapa, independientemente de la técnica de síntesis, se observa que los sistemas que liberan más lentos son las micropartículas más hidrofóbicas sintetizadas por atomización y secado (S-LG75:L) con una velocidad de 0,87  $\mu\text{g TMX} / \text{h}$ , y las nanopartículas E-LG75:L por emulsión/evaporación son las que presentan una mayor velocidad (79,43  $\mu\text{g TMX} / \text{h}$ ).

## 5.- MODELOS MATEMÁTICOS

La liberación in vitro de los sistemas sintetizados por las tres técnicas se ajustó a los tres modelos matemáticos presentando en todos los casos unos buenos valores de coeficientes de regresión en diferentes etapas de la liberación en función de los sistemas.

### 5.1.- MICROESFERAS SINTETIZADAS POR ATOMIZACIÓN Y SECADO

Al aplicar la ecuación de Higuchi (Ecuación 3) y representar la cantidad liberada ( $M_t$ ) frente a la raíz cuadrada del tiempo ( $t^{1/2}$ ), Los valores de los correspondientes coeficientes de correlación pueden considerarse significativos (0,97 - 0,98) considerando entre el 97% y 100% de fármaco liberado. Los valores de la constante de difusión son superiores a 1 en todos los casos excepto para el sistema S-LG75:L (0,81  $\text{h}^{-1/2}$ ) que presentó el menor valor para  $K_0$  (Tabla

32). Conforme a esto podemos decir que todas las liberaciones son directamente proporcionales a la raíz cuadrada del tiempo (tiempo  $^{1/2}$ ) y que existe un proceso de difusión, aunque esto no implica necesariamente que sea el único proceso determinante de la liberación. Los sistemas que presentaron una mayor constante ( $K_0$ ) fueron los sistemas con el polímero PLGA 50:50: S-LG50; S-LG50:LG75 y S-LG50:L (1,51; 1,57; 1,63 h $^{-1/2}$  respectivamente)

Al aplicar la ecuación de Korsmeyer-Peppas (*Ecuación 4*) se obtiene, por linealización logarítmica, coeficientes de correlación entre 0,96 y 0,99 por lo que se puede determinar el exponente de liberación ( $n$ ) de los parámetros de la recta. El valor de ( $n$ ) corresponde a la pendiente de la recta y va a indicar el mecanismo de liberación. El valor obtenido es inferior a 0,43 para todos los sistemas estudiados, lo que nos indica que hay una dispersión de tamaños y no se puede determinar con exactitud un mecanismo de liberación, excepto para el caso del sistema S-LG75 cuyo valor es de 0,44 (*Tabla 32*), muy próximo a 0,43, lo que muestra que la liberación cumple la 2ª Ley de Fick de difusión siendo la única liberación fickiana (*Tabla 10*). Este modelo se ha aplicado a toda la liberación hasta el máximo liberado.

La ecuación de Hopfenberg (*Ecuación 5*) basada en la degradación polimérica, ha permitido determinar la velocidad de liberación directamente dependiente del área de la superficie y del tiempo. Cuando se estudió esta ecuación en las liberaciones *in vitro* obtenidas se descubrió que se pueden diferenciar claramente dos fases a las cuales se ajusta. Una primera etapa abarcaría desde el inicio de la liberación hasta un 45% - 50% de tamoxifeno liberado y la segunda etapa hasta una liberación del 90% - 95% (*Tabla 32*). El valor de la constante de liberación del fármaco,  $K$ , es directamente proporcional al grado de degradación polimérica. En todos los casos la primera etapa tiene una  $k$  superior a la segunda etapa, lo que nos indica que en esta primera fase la velocidad de liberación es mayor, y que a partir del 45% - 54% la liberación se ralentiza. Si nos fijamos en la composición polimérica vemos que aquellas microesferas con mayor proporción de PLA en la matriz tienen una  $K$  menor, lo que es lógico ya que al ser más hidrófobos su velocidad de degradación se ve disminuida. Esta diferencia se observa perfectamente entre S-LG75 y S-LG50 (0,028 y 0,741 ( $\mu\text{gTMX/mgMS}\cdot\mu\text{m}$ )/h respectivamente) o S-LG75:L y S-LG50:L (0,0094 y 0,556 ( $\mu\text{gTMX/mgMS}\cdot\mu\text{m}$ )/h respectivamente) comparando ambas etapas por separado (*Tabla 32*). Los valores de  $K$  de la mezcla copolimérica PLGA 75/25 + PLGA 50/50 son mayores que las de la composición PLGA 75/25 como corresponde a una liberación más rápida del fármaco, consecuencia de una mayor tasa de degradación debido al componente hidrofílico de la composición polimérica.

## 5.2.- NANOPARTÍCULAS SINTETIZADAS POR EMULSIÓN/EVAPORACIÓN:

Al aplicar la ecuación de Higuchi (*Ecuación 3*) y representar la cantidad liberada ( $M_t$ ) frente a la raíz cuadrada del tiempo ( $t^{1/2}$ ), los valores de los correspondientes coeficientes de correlación pueden considerarse significativos (0,87 - 0,96) considerando entre el 71% y 100% de fármaco liberado. Los valores de la constante de difusión ( $K_0$ ) se encuentran entre 8,3 y 57,5  $h^{-1/2}$  (EF-LG50:LG75 y E-LG75:L respectivamente) (*Tabla 33*). Las emulsiones 5% TMX y 10% TMX presentaron unos valores de constante de difusión muy similares excepto para el sistema E-LG75:L 10% TMX que fue muy superior lo que se observa en el inserto de las primeras horas de liberación (Figura 52 B). En el caso de las emulsiones funcionalizadas con fólico solo se obtuvo linealidad en la última etapa de la liberación (a partir del 73 – 77% hasta el 100% de la liberación). Esto es debido a que el 77% se libera muy rápido, en los 20 minutos iniciales y no se ajusta a la ecuación de Higuchi. Sin embargo, en el caso del sistema EF-LG50:L, que presenta una liberación más lenta, la ecuación de Higuchi se ajusta desde el principio de la liberación hasta 95%.

Al aplicar la ecuación de Korsmeyer-Peppas (*Ecuación 4*) se obtiene, por linealización logarítmica, coeficientes de correlación entre 0,86 y 0,97 por lo que se puede determinar el exponente de liberación ( $n$ ) de los parámetros de la recta. El valor de ( $n$ ) corresponde a la pendiente de la recta y va a indicar el mecanismo de liberación. El valor obtenido es inferior a 0,43 para todos los sistemas estudiados y no se puede determinar con exactitud un mecanismo de liberación (*Tabla 33*). Este modelo se ha aplicado a toda la liberación hasta el máximo liberado (100%) pero no determina si el hinchamiento o la difusión intervienen en la liberación del fármaco.

Con la ecuación de Hopfenberg (*Ecuación 5*) se puede determinar la velocidad de liberación directamente dependiente del área de la superficie y del tiempo. Cuando se estudió esta ecuación en las liberaciones *in vitro* obtenidas se descubrió que se pueden diferenciar claramente dos fases a las cuales se ajusta para las emulsiones sin funcionalizar 10% TMX. Una primera etapa abarcaría desde el inicio de la liberación hasta un 59% - 70% de tamoxifeno liberado y la segunda etapa hasta una liberación del 100% (*Tabla 33*). El valor de la constante de liberación del fármaco,  $K$ , es directamente proporcional al grado de degradación polimérica. En todos los casos la primera etapa tiene una  $K$  superior a la segunda etapa, lo que nos indica

que en esta primera fase la velocidad de liberación es mayor, y que después se ralentiza, siendo el sistema E-LG75:L el que presento una mayor constante de liberación ( $0,85 \mu\text{gTMX}/\text{mgMS} \cdot \mu\text{m}$ ).

### 5.3.-NANOGELES SINTETIZADOS POR POLIMERIZACIÓN RADICALARIA:

Al aplicar la ecuación de Higuchi (*Ecuación 3*) a la liberación in vitro de los nanohidrogeles se obtuvieron unos coeficientes de correlación significativos (0,90 – 0,98) considerando el 100% de fármaco liberado. En el caso de los sistemas funcionalizados (NG-F) se diferencian dos etapas. La primera etapa abarca hasta un 60 - 65% de la liberación (sistemas con 7% de entrecruzante) y 87% en los sistemas con 5% de entrecruzante. Así, los valores de la constante de difusión ( $K_0$ ) fueron superiores en los sistemas con 5% de entrecruzante frente a sus homólogos con un 7% y los funcionalizados con fólico presentan mayores valores. Los valores alcanzados fueron  $7,7 - 7,1 \text{ h}^{-\frac{1}{2}}$  (NG-80.10.10.5x y NG-83.7.10.5x respectivamente) y cuando se funcionalizaron presentaron una mayor constante de difusión ( $15$  y  $16 \text{ h}^{-\frac{1}{2}}$  para NG-F-80.10.10.5x y NG-F-83.7.10.5x respectivamente) (*Tabla 34*). Estos valores disminuyeron cuando se aumentó el entrecruzante en el sistema al 7% ( $4,4$  y  $3,5 \text{ h}^{-\frac{1}{2}}$  para NG-80.10.10.7x y NG-83.7.10.7x respectivamente, pasando a  $13$  y  $8 \text{ h}^{-\frac{1}{2}}$  para NG-F-80.10.10.7x y NG-F-83.7.10.7x respectivamente).

Al aplicar la ecuación de Korsmeyer-Peppas (*Ecuación 4*) se obtiene, por linealización logarítmica, buenos coeficientes de correlación entre 0,93 y 0,99. Este modelo se ha aplicado a toda la liberación hasta el máximo liberado (87 - 100%). Los sistemas funcionalizados con un entrecruzamiento del 7% (NG-F-80.10.10.7X y NG-F-83.7.10.7X) demostraron dos etapas siendo la primera hasta una liberación del 65% y la segunda hasta el 100% (*Tabla 34*). Los valores de “n” obtenidos están entre 0,25 – 0,59, siendo los sistemas NG-F-80.10.10.7X, NG-80.10.10.5X y NG-83.7.10.5X (que presentaron valores de 0,43; 0,42 y 0,44) los sistemas que mostraron una liberación de tipo fickiana (*Tabla 10*).

En estos sistemas no se estudió la ecuación de Hofenberg ya que por definición no se debe aplicar al ser sistemas no biodegradables. Los NG sintetizados no son biodegradables por los monómeros usados y debido al entrecruzamiento.

**Tabla 32:** Resultados de la aplicación de los modelos matemáticos (Higuchi, Korsmeyer-Peppas y Hopfenberg) sobre los valores de la liberación de las micropartículas de poliésteres sintetizadas por atomización y secado.

FORMULACIÓN	Higuchi			Korsmeyer-Peppas			Hopfenberg					
	$K_0 (h^{-1/2})$	$r^2$	% liberación	n	$r^2$	% liberación	K (1ª etapa)	$r^2$	% liberación	K (2ª etapa)	$r^2$	% liberación
S-LG50	1,51	0,97	98,7	0,22	0,96	86	0,741	0,94	0 - 50	0,049	0,97	57 - 90
S-LG75	1,35	0,98	97	0,44	0,96	100	0,028	0,96	0 - 45	0,023	0,95	45 - 90
S-LG50:LG75	1,57	0,97	98	0,32	0,99	100	0,08	0,90	0 - 45	0,033	0,96	54 - 94
S-LG50:L	1,63	0,97	100	0,18	0,98	100	0,556	0,99	0 - 48	0,297	0,96	55 - 95
S-PL75:L	0,81	0,98	100	0,31	0,96	100	0,0094	0,95	0 - 45	0,0081	0,98	45 - 90

$K$  de Hopfenberg:  $(\mu gTMX/mgMS*\mu m)/h$ ;  $r^2$ : coeficiente de correlación.

**Tabla 33:** Resultados de la aplicación de los modelos matemáticos (Higuchi, Korsmeyer-Peppas y Hopfenberg) sobre los valores de la liberación de las nanopartículas de poliésteres sintetizadas por emulsión / evaporación.

	FORMULACIÓN	Higuchi			Korsmeyer-Peppas			Hopfenberg					
		$K_0 (h^{-1/2})$	$r^2$	% lib.	n	$r^2$	% lib.	K	$r^2$	% lib.	K	$r^2$	% lib.
5% TMX	E- LG50	25,22	0,89	89,9	0,16	0,92	56-100	-	-	-	-	-	-
	E-LG50:LG75	15,76	0,89	88,2	0,13	0,86	56-100	-	-	-	-	-	-
	E-LG75:L	14,02	0,89	71,8	0,15	0,97	48-99	-	-	-	-	-	-
10% TMX	E- LG50	22,14	0,9	71	0,26	0,96	22-100	0,19	0,85	59	0,03	0,98	59 - 100
	E-LG50:LG75	26,43	0,87	79	0,23	0,93	26 - 100	0,36	0,83	59	0,06	0,98	59 - 100
	E-LG75:L	57,48	0,89	73	0,12	0,91	46 - 100	0,85	0,84	70	0,02	0,96	70 -100
Fólico	EF- LG50	10,3	0,96	77 - 100	0,1	0,96	100	0,3	0,96	100	-	-	-
	EF-LG50:LG75	8,35	0,94	73 - 96	0,1	0,93	100	0,15	0,85	96	-	-	-
	EF- LG50:L	17,6	0,91	0 - 95	0,1	0,96	100	0,08	0,86	100	-	-	-

$K$  de Hopfenberg:  $(\mu gTMX/mgMS*\mu m)/h$ ; Lib.: % de Liberación;  $r^2$ : coeficiente de correlación

**Tabla 34:** Resultados de la aplicación de los modelos matemáticos (Higuchi y Korsmeyer-Peppas) sobre los valores de la liberación de los nanohidrogeles sintetizadas por polimerización.

FORMULACIÓN	Higuchi						Korsmeyer-Peppas					
	$K_0 (h^{-1/2})$	$r^2$	% lib.	$K_0 (h^{-1/2})$	$r^2$	% lib.	n	$r^2$	% lib.	n	$r^2$	% lib.
NG-80.10.10.5x	7,7	0,96	88	-	-	-	0,42	0,99	88	-	-	-
NG-80.10.10.7x	4,4	0,93	100	-	-	-	0,22	0,99	100	-	-	-
NG-83.7.10.5x	7,1	0,96	100	-	-	-	0,44	0,93	100	-	-	-
NG-83.7.10.7x	3,5	0,90	100	-	-	-	0,41	0,96	100	-	-	-
NG-F-80.10.10.5x	15,4	0,94	87	-	-	-	0,25	0,98	92%	-	-	-
NG-F-80.10.10.7x	13,17	0,97	65	2,47	0,98	100	0,43	0,93	65%	0,13	0,99	100
NG-F-83.7.10.5x	16,5	0,96	87	1,6	0,96	100	0,59	0,98	87%	-	-	-
NG-F-83.7.10.7x	8,1	0,93	60	2,13	0,94	100	0,26	0,97	62%	0,12	0,98	100

Lib.: % de Liberación,  $r^2$ : coeficiente de correlación.



## 6.- ESTUDIOS CELULARES

Una vez obtenidos los resultados *in vitro* y su caracterización se procedió a la evaluación de los sistemas en cultivos celulares a través de estudios de viabilidad celular e internalización celular.

### 6.1.- ESTUDIO DE VIABILIDAD CELULAR

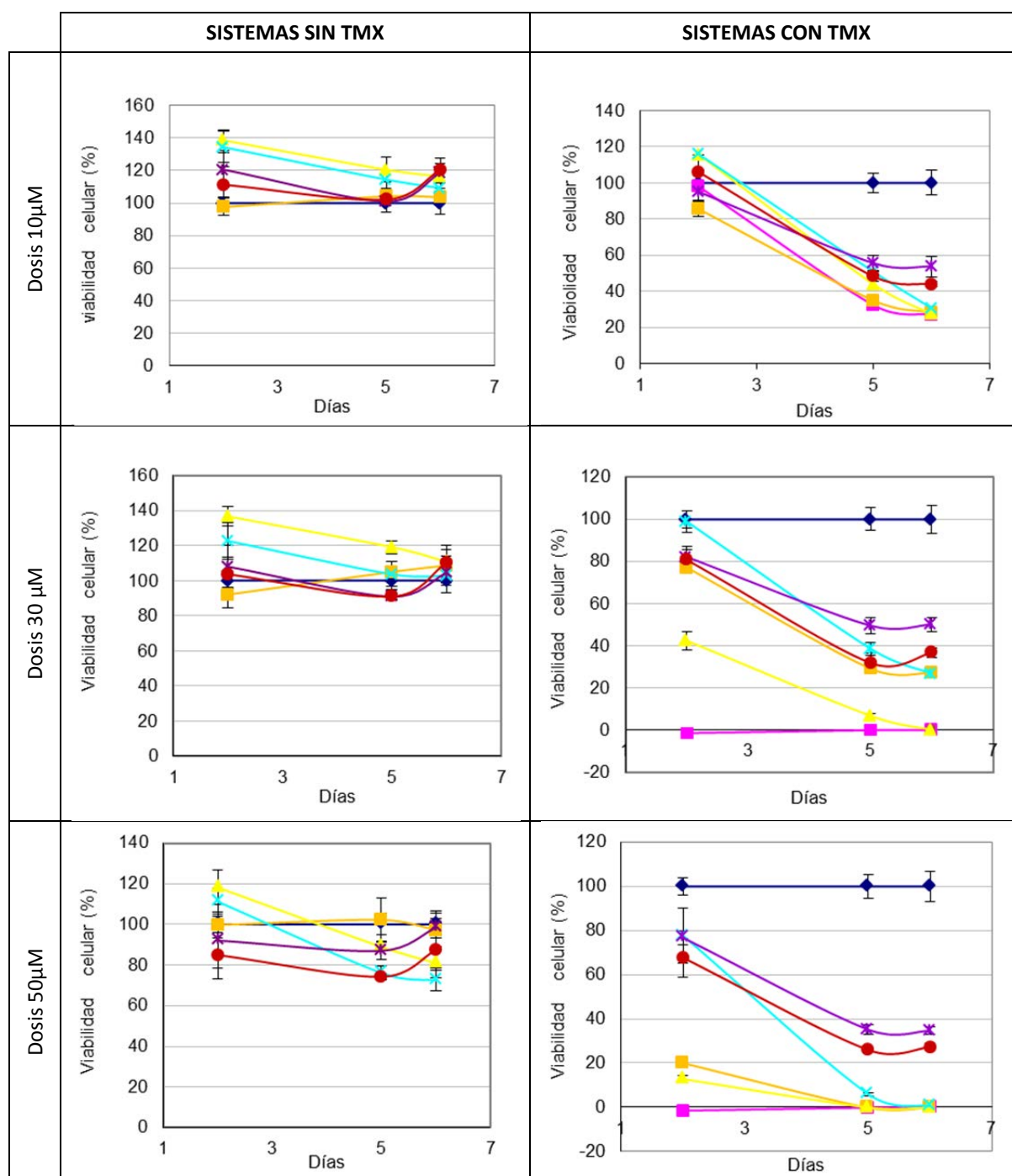
Mediante el ensayo del MTT, que consiste en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT), se han podido completar la evaluación de todos los sistemas obteniendo resultados sobre su citocompatibilidad (cuando los sistemas no incorporaron fármaco) y su citotoxicidad y eficacia terapéutica (cuando los sistemas incorporaron fármaco).

#### A) Micropartículas basadas en poliésteres alifáticos sintetizadas por atomización y secado:

En general las MS presentaron una buena citocompatibilidad con las tres líneas celulares. El intervalo de supervivencia de las células MCF7 cuando estuvieron en contacto con las partículas sin fármaco (partículas blanco) fue de  $139 \pm 6\%$  y  $72 \pm 5\%$  a una concentración entre 75,9 - 474  $\mu\text{g/ml}$ . Hay que tener en cuenta que para una dosis de 10  $\mu\text{M}$  de TMX corresponde a una concentración de MS de 75,9 – 94,9  $\mu\text{g/ml}$ , una dosis de 30  $\mu\text{M}$  equivale a una concentración de MS de 227,8 – 284,6  $\mu\text{g/ml}$  y una dosis de 50  $\mu\text{M}$  corresponde a una concentración de MS de 380 – 474  $\mu\text{g/ml}$ .

A bajas concentraciones parece que estos sistemas sin fármaco producen una ligera proliferación celular a cortos periodos de tiempo, este efecto es más significativo en S-LG50 y S-LG50:LG75 (Figura 54).

Tres concentraciones de TMX (10, 30, y 50  $\mu\text{M}$ ) fueron administrados a la línea celular MCF7, mediante el fármaco en disolución o incluido en los sistemas elaborados por la técnica de atomización y secado (spray dryer). La eficacia *in vitro* de los sistemas con el fármaco incorporado fue determinado a tres tiempos (2, 5 y 6 días). La viabilidad celular en presencia de 10  $\mu\text{M}$  de TMX administrado a través de los sistemas fue similar al del fármaco en disolución (Figura 54) destacándose los sistemas S-LG50:L-TMX y S-LG75:L-TMX que producen una menor actividad citotóxica a los 6 días de exposición.



**Figura 54:** Viabilidad celular (%) de la línea celular MCF7 en contacto con los sistemas sintetizados por atomización y secado (spray dryer) con fármaco a tres dosis distintas (10, 30 y 50  $\mu$ M) y MS sin fármaco a una concentración equivalente. ( $\blacktriangle$ ) S-LG50, ( $\blacksquare$ ) S-LG75, ( $\bullet$ ) S-LG50:L, ( $\times$ ) S-LG75:L, ( $\blacklozenge$ ) células, ( $\times$ ) S-LG50:LG75, ( $\blacksquare$ ) TMX en disolución.

Cuando el fármaco en disolución se administró a una concentración de 30  $\mu\text{M}$  ningún cultivo celular sobrevivió después del primer tiempo de medida. Las formulaciones poliméricas, a esta misma concentración, demostraron una viabilidad celular dependiente del tiempo. En general se observó una correlación con la velocidad de liberación del fármaco. De esta forma, el sistema S-LG50-TMX que presentó la mayor velocidad de liberación (*Tabla 29*), fue el sistema más eficiente disminuyendo la viabilidad celular, tanto a 30 como a 50  $\mu\text{M}$ . En general, la viabilidad celular aumentó en el mismo orden que las velocidades de liberación disminuían. La mayor concentración de TMX estudiada (50  $\mu\text{M}$ ) produjo un efecto equivalente al descrito anteriormente (30  $\mu\text{M}$ ) en la viabilidad celular. En este caso el fármaco en disolución causó una muerte celular total y los sistemas produjeron una disminución progresiva dependiente de tiempo y de composición copolimérica. Por todo esto, la eficacia de las microesferas sintetizadas por atomización y secado (spray dryer) fue confirmada en la línea celular MCF7.

#### **B) Nanopartículas basadas en poliésteres alifáticos sintetizadas por emulsión/evaporación:**

Las nanopartículas sintetizadas por emulsión/evaporación sin fármaco, funcionalizadas y sin funcionalizar, fueron estudiadas en tres líneas celulares (HeLa, MCF7, T47D) (*Figuras 55, 56, 57* respectivamente) a una concentración de 6 y 10  $\mu\text{M}$ . Esta concentración de fármaco equivale a una concentración de partículas comprendidas entre 16,9 y 24,2  $\mu\text{g NP/ml}$  en función de la cantidad de fármaco incorporada en cada sistema (*Anexo V*). En todos los casos las NP sin fármaco (E-LG50, E-LG50:LG75, E-LG75:L, EF-LG50, EF-LG50:LG75, EF-LG50:L) presentaron una buena citocompatibilidad celular, ya que en las tres líneas celulares (HeLa, T47D y MCF7) se observó una viabilidad celular superior al 80% en los tres tiempo medidos (1, 3 y 6 días). Los resultados obtenidos de la citocompatibilidad por línea celular son:

- La línea celular HeLa (*Figura 55*), en presencia de las NP sin funcionalizar parece que presentan un ligero incremento en la proliferación celular. Mientras que las partículas funcionalizadas con fólico disminuyeron ligeramente la viabilidad celular, aunque se mantuvo siempre por encima del 80%.
- La línea celular MCF7 (*Figura 56*), en presencia de las NP y las NP-F mostró una viabilidad celular por encima del 80%, excepto en el caso de las NP EF-LG50 que, a

tiempos cortos (1<sup>er</sup> día), presentó una viabilidad celular ligeramente inferior al 80% (76%) pero que a tiempos largos (6<sup>o</sup> día) aumentó hasta el 99%.

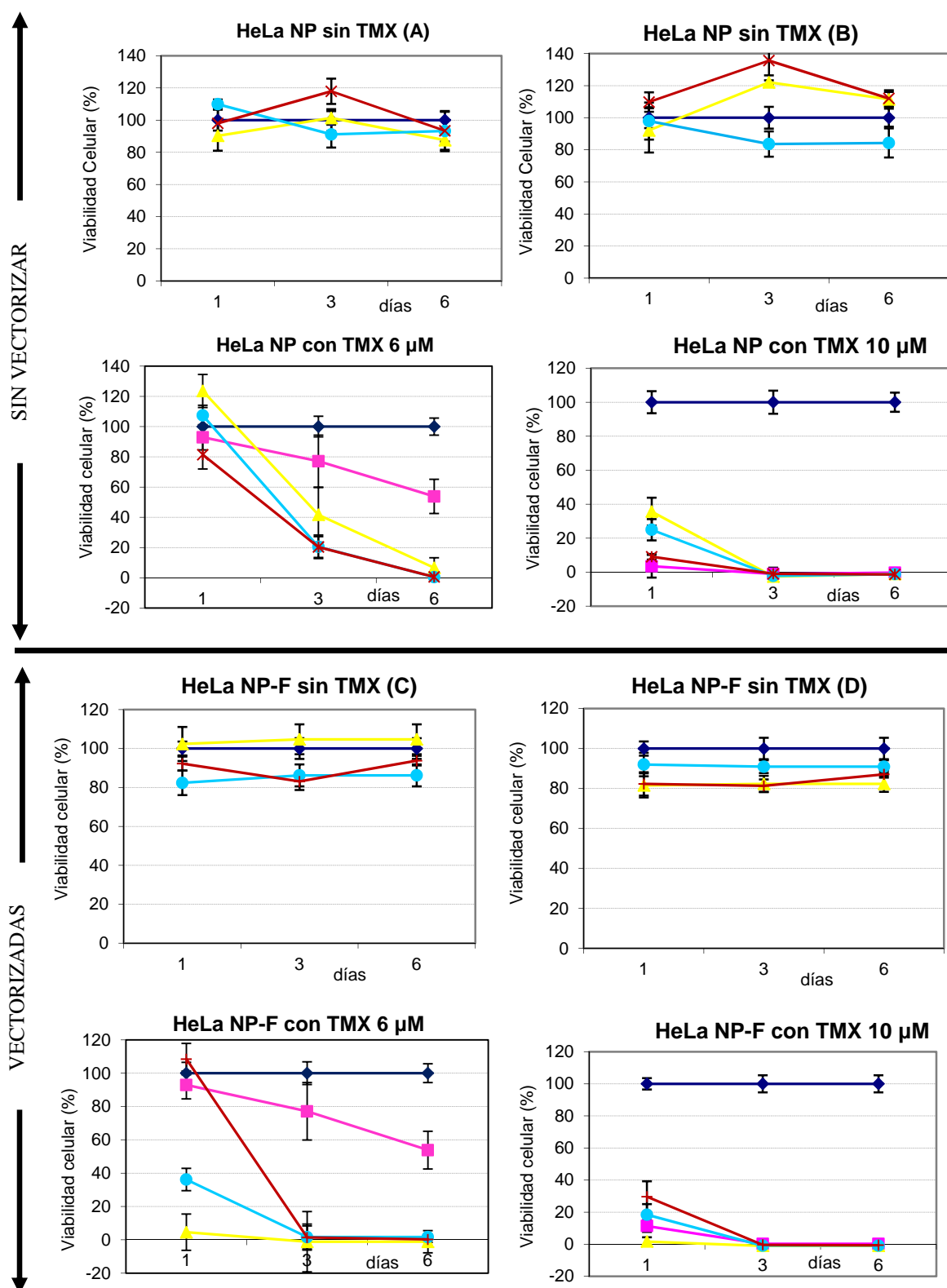
- La línea celular T47D (*Figura 57*), en presencia de las partículas sin fólico (NP) y las funcionalizadas con fólico (NP-F), se observó una viabilidad celular por encima del 80% a todas las concentraciones estudiadas. Al igual que en las MCF7, las NP EF-LG50 a la menor concentración producen un mayor descenso en la viabilidad celular (71%) pero que a tiempos largos (6<sup>o</sup> día) se recupera (106%). En esta línea celular, las NP-F a tiempos largos (6<sup>o</sup> día) parece que produce una ligera proliferación celular alcanzando 111%.

Cuando las nanopartículas incorporaron TMX produjeron una muerte celular tiempo dependiente reduciendo la viabilidad celular dependiendo de la composición copolimérica, la funcionalización con fólico y la línea celular.

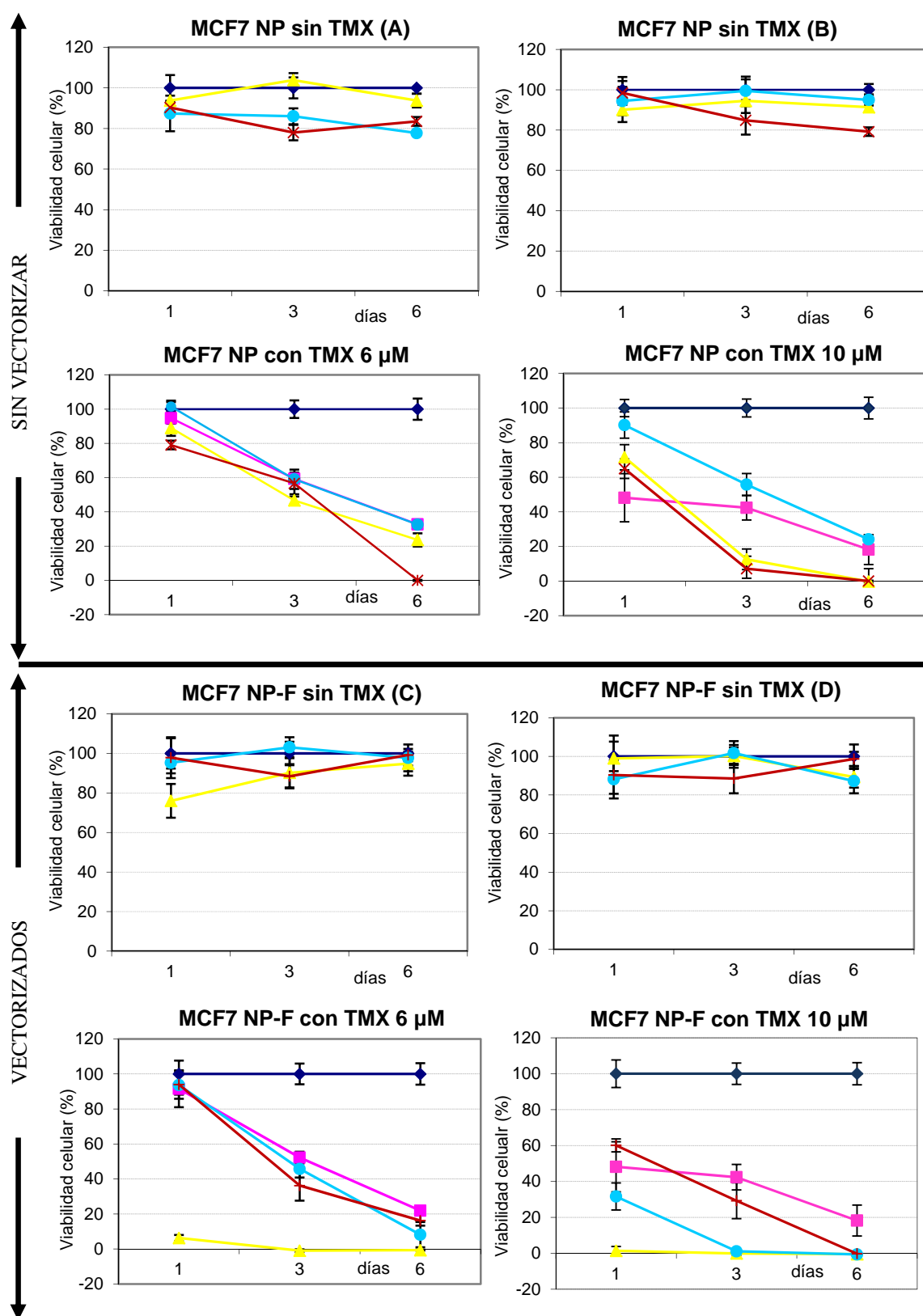
- **HeLa:** NP-TMX y NP-F-TMX demostraron efectividad antitumoral a medida que se libera el fármaco (*Figura 55*). Las NP-TMX sin funcionalizar tanto a 6 como 10  $\mu$ M produjeron la muerte celular total al 6<sup>o</sup> día. A 6  $\mu$ M al 3<sup>er</sup> día disminuye la viabilidad celular por debajo del 50% produciendo la muerte total al 6<sup>o</sup> día, mientras que el fármaco en disolución solo llega a conseguir el 54% de viabilidad. A 10  $\mu$ M desde el primer día la viabilidad celular disminuye por debajo del 50% consiguiendo una muerte total al tercer día tanto con el fármaco en disolución como con los sistemas. Al aumentar la concentración del TMX de 6 a 10  $\mu$ M se produce un aumento en la citotoxicidad debido a que la actividad del fármaco es dosis dependiente. Las E-LG50-TMX fueron las que menos actividad citotóxica presentaron seguidas de las E-LG50:LG75 y después por E-LG75:L. Todas ellas, a 6  $\mu$ M, presentaron una mayor actividad que el fármaco en disolución mientras que a 10  $\mu$ M fue el fármaco el de mayor actividad. Cuando las partículas se funcionalizaron con fólico (NP-F-TMX) se produce un incremento en la actividad antitumoral tanto a 6 como 10  $\mu$ M. A 6  $\mu$ M se produce la muerte celular total a partir del tercer día. En el primer día, las partículas EF-LG50, son las más citotóxicas reduciendo la viabilidad celular a 4%. Esta síntesis junto con EF-LG50:LG75 presentaron una mayor actividad que el TMX en disolución (87%) en el primer día. El último sistema EF-LG50:L fue menos citotóxico a este mismo tiempo. Esta toxicidad aumento cuando se incrementó la concentración a 10  $\mu$ M, manteniendo el mismo orden de toxicidad pero con un máximo de viabilidad de

29% solo en el primer día ya que al 3<sup>er</sup> día se produce la muerte celular de todo el cultivo.

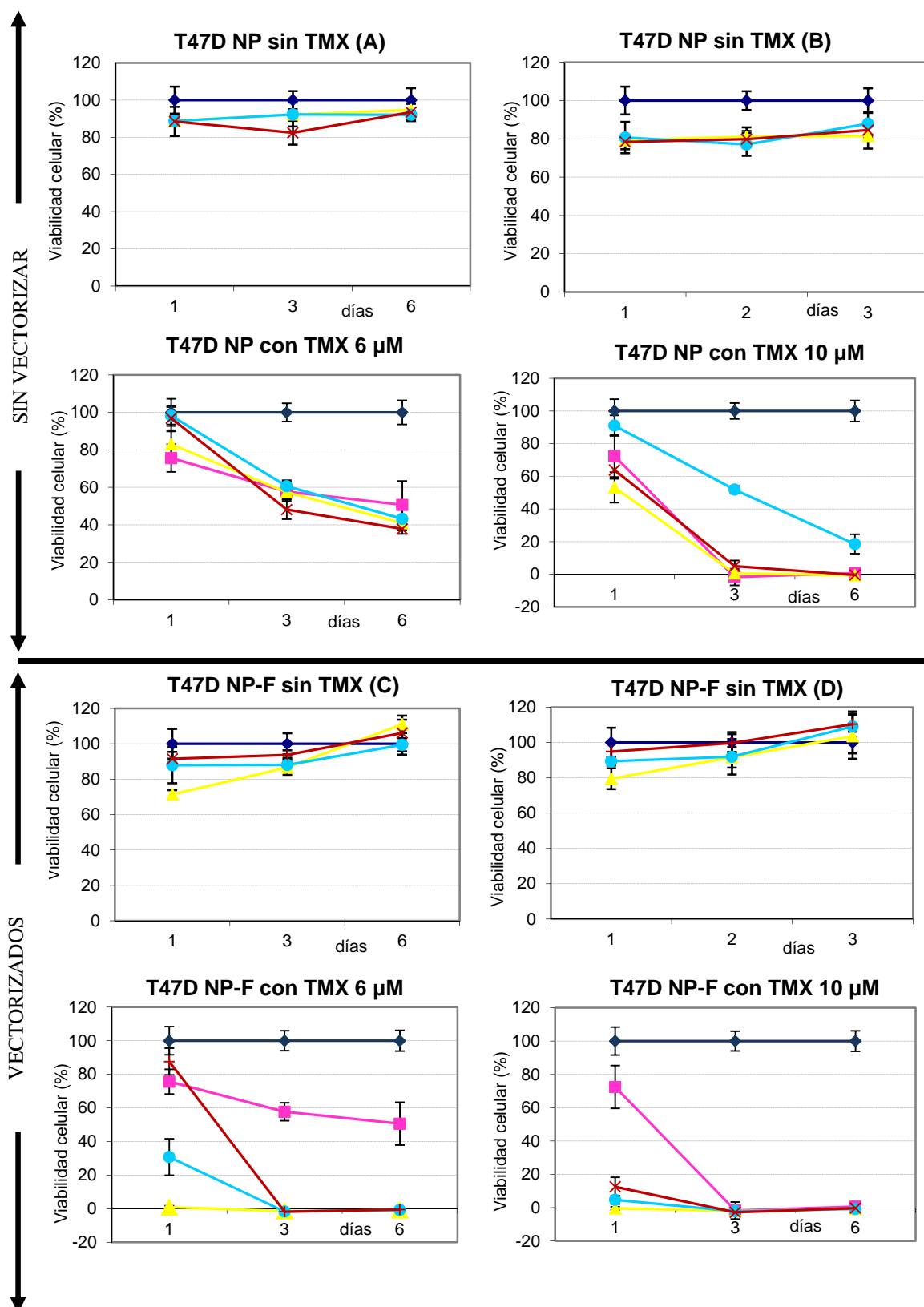
- **MCF7:** En esta línea celular las partículas con TMX funcionalizadas y sin funcionalizar tuvieron actividad antitumoral produciendo una disminución de la viabilidad celular similar a la del fármaco a 6  $\mu\text{M}$  (*Figura 56*). Excepto para el sistema E-LG75:L sin funcionalizar, el cual, a la dosis de 6  $\mu\text{M}$ , presentó una mayor actividad al 6<sup>o</sup> día produciendo una muerte celular total, así como el sistema EF-LG50 funcionalizadas, que produce una muerte celular prácticamente desde el primer día. A 10  $\mu\text{M}$  la citotoxicidad se ve aumentada sobre todo en los sistemas E-LG50 y E-LG75:L que, en el 6<sup>o</sup> día, produjeron la muerte celular total, mientras que el TMX en disolución solo produjo el descenso de la viabilidad celular hasta un 18%. Cuando se funcionalizaron con el ácido fólico las partículas presentaron una mayor actividad demostrando que las NP EF-LG50 producen una muerte celular desde el primer día. Se consiguió una muerte celular total al 6<sup>o</sup> día con todos los sistemas siendo el sistema EF-LG50:L el menos citotóxico en este caso.
- **T47D:** En esta línea celular (*Figura 57*) el fármaco vehiculizado en las nanopartículas no funcionalizadas tuvo una actividad similar a la del TMX en disolución, reduciendo la viabilidad celular hasta un 37,7% a la dosis de 6  $\mu\text{M}$ . A 10  $\mu\text{M}$  los sistemas E-LG50 y E-LG75:L produjeron la muerte celular total desde el 3<sup>er</sup> día al igual que el fármaco. El tercer sistema E-LG50:LG75 fue el menos citotóxico produciendo una disminución de la viabilidad del 18% al sexto día. Cuando los sistemas se funcionalizaron con ácido fólico la efectividad de las partículas se vio, una vez más, aumentada produciéndose la muerte celular desde el 3<sup>er</sup> día a 6  $\mu\text{M}$ , y a 10  $\mu\text{M}$  prácticamente desde el primer día. A 6  $\mu\text{M}$  se observa, en el primer día, que el sistema EF-LG50 produce una mayor citotoxicidad seguida de EF-LG50:LG75 y EF-LG50:L, presentado, todos, una actividad mayor que el fármaco en disolución ya que solo consigue una viabilidad del 50%. A 10  $\mu\text{M}$  la viabilidad celular se redujo sustancialmente desde el primer día a 12% como máximo, llegando a la muerte celular del cultivo desde el tercer día con los sistemas funcionalizados.



**Figura 55:** Viabilidad celular (%) de la línea celular HeLa en contacto con las nanopartículas sintetizadas por emulsión, vectorizadas y sin vectorizar, sin o con fármaco a 6 y 10  $\mu$ M de TMX. (♦) Células control, (■) TMX (tamoxifeno). **NP:** Nanopartículas sin vectorizar (▲) E-LG50, (●) E-LG50:LG75, (x) E-LG75:L, y **NP-F:** nanopartículas vectorizadas con fólico (▲) EF-LG50, (●) EF-LG50:LG75, (+) EF-LG50:L. Concentración de NP sin TMX: A) 20,3 – 23,4  $\mu$ g NP/ml; B) 34 – 39  $\mu$ g NP/ml; C) 16,9 – 24,2  $\mu$ g NP/ml; D) 28,2 – 40,4  $\mu$ g NP/ml.



**Figura 56:** Viabilidad celular (%) de la línea celular MCF7 en contacto con las nanopartículas sintetizadas por emulsión, vectorizadas y sin vectorizar, sin o con fármaco a 6 y 10  $\mu$ M de TMX. (♦) Células control, (■) TMX (tamoxifeno), NP: Nanopartículas sin vectorizar (▲) E-LG50, (●) E-LG50:LG75, (x) E-LG75:L y NP-F: nanopartículas vectorizadas con fólico (▲) EF-LG50, (●) EF-LG50:LG75, (+) EF-LG50:L. Concentración de NP sin TMX A) 20,3 – 23,4  $\mu$ g NP/ml; B) 34 – 39  $\mu$ g NP/ml; C) 16,9 – 24,2  $\mu$ g NP/ml; D) 28,2 – 40,4  $\mu$ g NP/ml.



**Figura 57:** Viabilidad celular (%) de la línea celular T47D en contacto con las nanopartículas sintetizadas por emulsión, vectorizadas y sin vectorizar, sin o con TMX a 6 y 10  $\mu$ M de TMX. ( $\blacklozenge$ ) Células control, ( $\blacksquare$ ) TMX (tamoxifeno), **NP:** **Nanopartículas sin vectorizar** ( $\blacktriangle$ ) E-LG50, ( $\bullet$ ) E-LG50:LG75, ( $\times$ ) E-LG75:L y **NP-F:** **nanopartículas vectorizadas con fólico** ( $\blacktriangle$ ) EF-LG50, ( $\bullet$ ) EF-LG50:LG75, ( $+$ ) EF-LG50:L. Concentración de NP sin TMX A) 20,3 – 23,4  $\mu$ g NP/ml; B) 34 – 39  $\mu$ g NP/ml; C) 16,9 – 24,2  $\mu$ g NP/ml; D) 28,2 – 40,4  $\mu$ g NP/ml.



### C) Nanohidrogeles sintetizados por polimerización radicalaria

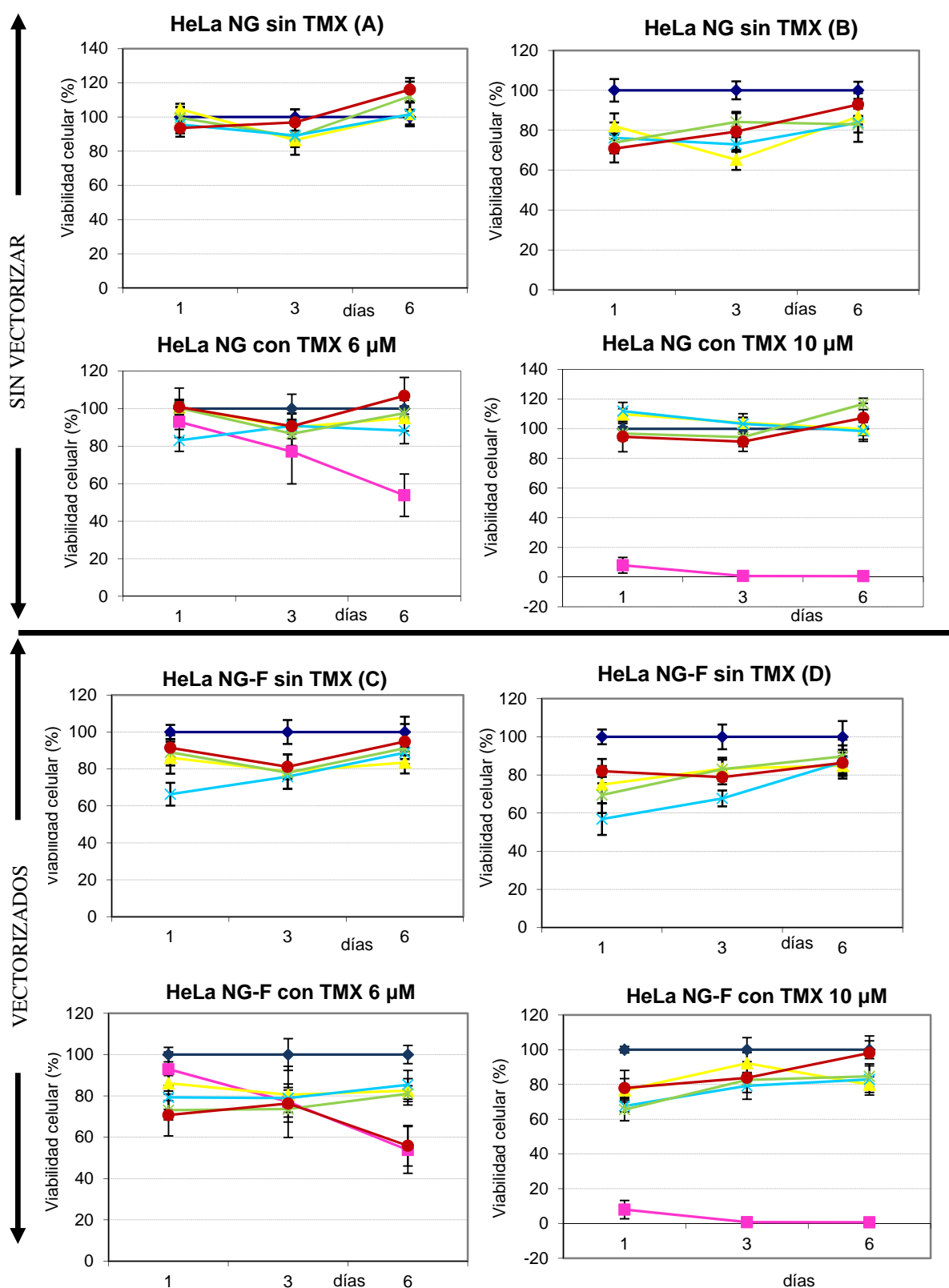
Los nanogeles (funcionalizados y sin funcionalizar) presentaron una buena citocompatibilidad en las tres líneas celulares (HeLa, MCF 7 y T47D) (*Figura 58, 59, 60*) a igual que las nanopartículas. Los NG, sin TMX y sin funcionalizar a alta concentración (136  $\mu\text{g/ml}$  – 72,8  $\mu\text{g/ml}$ ), inicialmente disminuyen la población celular hasta un 70% en el caso de las HeLa y un 80% en las MCF7 y T47D. Este efecto no es significativo ya que el cultivo celular en las tres líneas se recupera progresivamente desde el 3<sup>er</sup> día llegando a tener una viabilidad celular del 100% al 6<sup>o</sup> día. La citocompatibilidad de los NG funcionalizados (NG-F) también fue buena ya que las líneas celulares tuvieron el mismo comportamiento que con los sistemas sin funcionalizar. En este caso cabe destacar que el descenso inicial en la viabilidad celular con los sistemas funcionalizados sin fármaco llegó a ser hasta un 50% aproximadamente a 10  $\mu\text{M}$ , sin embargo el cultivo celular fue capaz de recuperar la viabilidad celular entre 80-100% al 6<sup>o</sup> día en las tres líneas celulares estudiadas. El hecho de que las células presenten un mayor descenso en su viabilidad celular puede ser debido al incremento de la internalización celular de los sistemas por la presencia de fólico en la partícula. Este resultado no se observó en los anteriores sistemas descritos (nanopartículas funcionalizadas) ya que los nanogeles presentaron una mayor incorporación del ácido fólico en la superficie (*Tabla 18 y 19*).

En cuanto a la actividad de los sistemas cuando incorporaron TMX en su interior, varió dependiendo de la línea celular y del sistema:

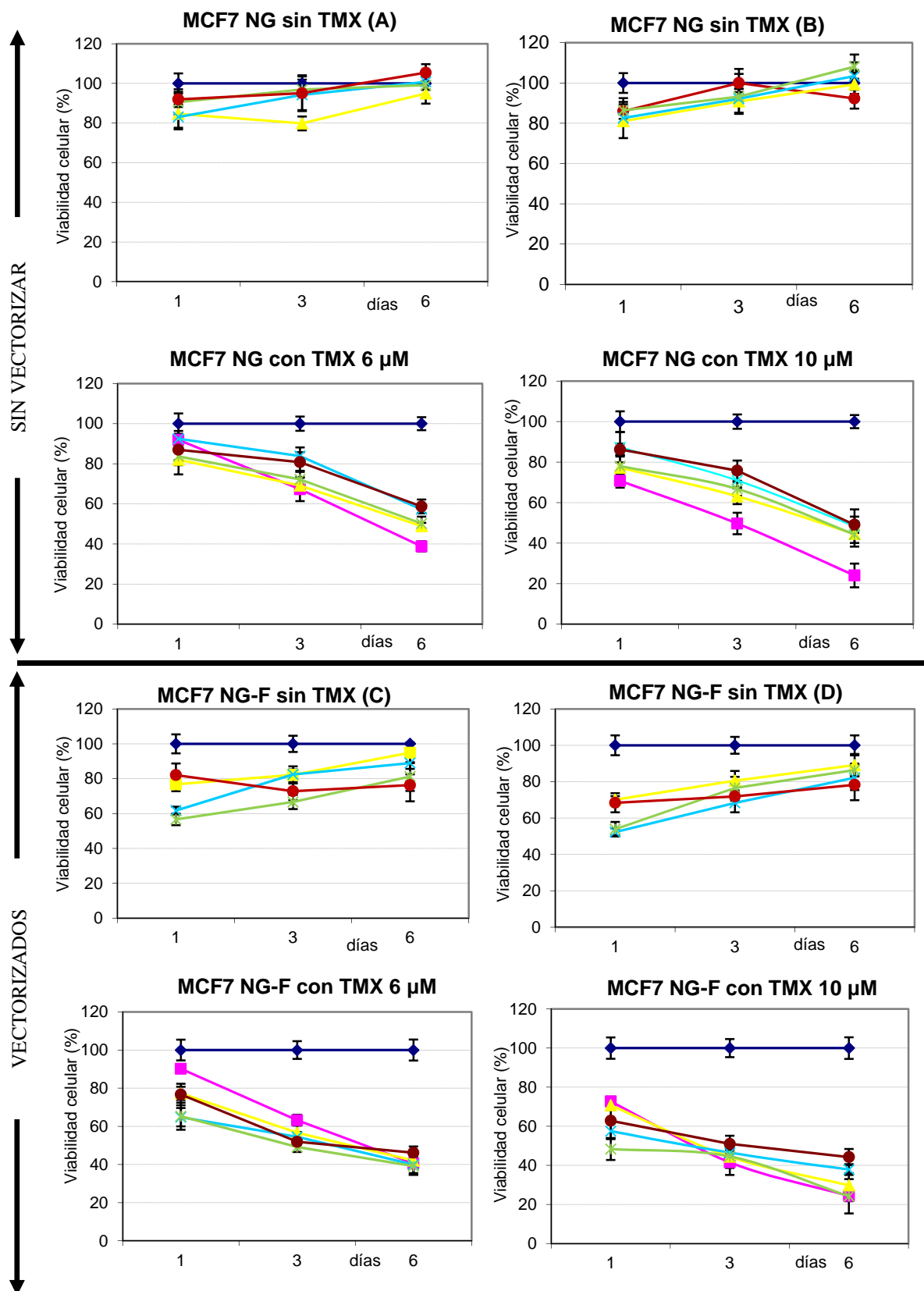
- **HeLa:** en cuanto a la vehiculización del TMX incluido en los nanogeles (*Figura 58*), en las células HeLa, los NG-TMX no parecen producir ningún efecto en la viabilidad celular. El fármaco en disolución tampoco presenta un gran efecto ya que consigue valores de 54% de viabilidad al 6<sup>o</sup> día a 6  $\text{Mm}$ , sin embargo a 10  $\mu\text{M}$  sí que consigue la muerte celular al 3<sup>er</sup> día. Los NG funcionalizados con fólico a la concentración de 6  $\mu\text{M}$  parece que ejercen un efecto levemente mayor disminuyendo la viabilidad al 80% al 6<sup>o</sup> día y siendo el sistema NG-83.7.10.7X el que presentó un mayor efecto disminuyendo la viabilidad celular hasta un 55%, igual que el fármaco en disolución. A 10  $\mu\text{M}$  los sistemas no consiguen disminuir la viabilidad por debajo del 80% mientras que el fármaco en disolución consigue la muerte celular del cultivo al 3<sup>er</sup> día. Estos resultados tienen concordancia y sentido ya que las HeLa es una línea celular que no presenta receptores de estrógenos y por lo tanto la acción de los sistemas no es tan efectivo.

- MCF7:** en la línea celular MCF7 se observa un mayor efecto de los nanogeles con TMX (*Figura 59*) comparado con las HeLa. Los NG-TMX sin funcionalizar disminuyeron la viabilidad celular hasta 50% en el caso de NG-80.10.10.5X, NG-83.7.10.5X y un 58% con los NG NG-80.10.10.7X y NG-83.7.10.7X. Se observó que estos resultados están en concordancia con los estudios de liberación, produciendo una mayor actividad citotóxica los que liberaban más cantidad de fármaco (NG con 5% de entrecruzante) y cuando se aumentó la concentración del fármaco a 10  $\mu$ M se disminuyó la viabilidad a 44% - 49%. Sin embargo el TMX solo en disolución presento una mayor actividad antitumoral con una viabilidad del 38,8% a 6  $\mu$ M y 24% a 10  $\mu$ M. La actividad antitumoral de los sistemas mejoró cuando se funcionalizaron los nanogeles con ácido fólico. A tiempos cortos de incubación (1<sup>er</sup> día) y a 6  $\mu$ M, causan más efecto sobre la viabilidad celular (76,6 – 65%) que el fármaco en disolución (el cual solo redujo la población celular a un 90%), sin embargo al 6<sup>o</sup> día el efecto entre los NG-F-TMX y el TMX en disolución se igualan a un 39 – 42%. Lógicamente y como cabe esperar a 10  $\mu$ M se consigue disminuir la viabilidad celular un poco más, sobre todo en los sistemas NG-83.7.10.5X y NG-80.10.10.5X.
- T47D:** Los nanogeles en la línea celular T47D (*Figura 60*) presenta el mismo efecto y comportamiento que en la línea celular MCF7, lo cual tiene coherencia debido a que ambas líneas celulares son positivas para receptores de estrógeno. Los NG-TMX sin funcionalizar disminuyeron la viabilidad celular hasta 59% - 62%, al 6<sup>o</sup> día a 6  $\mu$ M, mientras que el TMX en disolución la disminuyó hasta un 44%. Cuando se aumentó la concentración de fármaco vehiculizado en los nanogeles a 10  $\mu$ M, se redujo la viabilidad a 51% - 45%, mientras que el TMX en disolución, directamente produjo la muerte celular al tercer día. Cuando los sistemas se funcionalizaron con ácido fólico aumentó la efectividad del fármaco, igual que en el caso de las MCF7. Los sistemas funcionalizados consiguen disminuir la viabilidad celular hasta un 59- 45% a 6  $\mu$ M y 55 – 37% a 10  $\mu$ M.

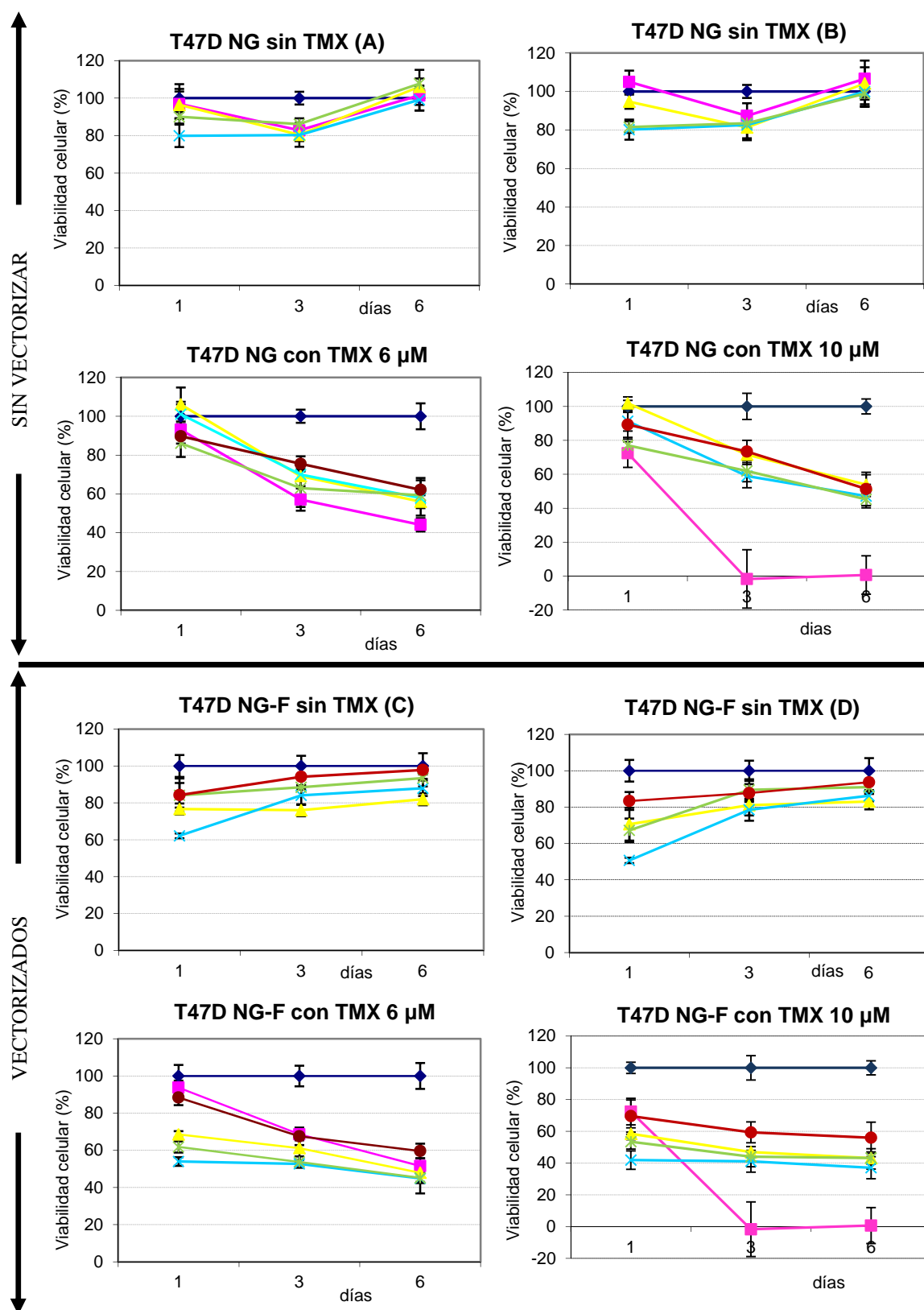
Se puede remarcar que los efectos sobre la viabilidad celular aumentaron cuando se funcionalizaron los nanogeles con ácido fólico en la línea celular MCF7 y T47D. A tiempos cortos de incubación (1<sup>er</sup> día), los NG-F-TMX presentaron más efecto sobre la viabilidad celular (reduciendo la población celular a un 76,6 – 65%) que el fármaco en disolución (90%), mientras que a tiempos largos (6<sup>o</sup> día) el efecto se igual alcanzando valores similares entre las NG-F y el TMX en disolución (39 – 42%).



**Figura 58:** Viabilidad celular (%) de la línea celular HeLa en contacto con los nanogeles vectorizados y sin vectorizar, sin o con fármaco a 6 y 10 µM de TMX. (▲) NG-80.10.10.5X, (×) NG-80.10.10.7X, (✱) NG-83.7.10.5X, (●) NG-83.7.10.7X, (◆) células control, (■) TMX (tamoxifeno), NG: Nanogeles sin vectorizar; NG-F: Nanogeles vectorizadas con ácido fólico. Concentración de NG sin TMX A) 44,3 – 56,4 µg NP/ml; B) 73,8 – 94 µg NP/ml; C) 44,2 – 44,4 µg NP/ml; D) 73,7 – 74 µg NP/ml.



**Figura 59:** Viabilidad celular (%) de la línea celular MCF7 en contacto con los nanogeles vectorizados y sin vectorizar, sin o con fármaco a 6 y 10  $\mu$ M de TMX. ( $\blacktriangle$ ) NG-80.10.10.5X, ( $\times$ ) NG-80.10.10.7X, ( $\ast$ ) NG-83.7.10.5X, ( $\bullet$ ) NG-83.7.10.7X, ( $\blacklozenge$ ) células control, ( $\blacksquare$ ) TMX (tamoxifeno), NG: Nanogeles sin vectorizar; NG-F: Nanogeles vectorizados con ácido fólico. Concentración de NG sin TMX A) 44,3 – 56,4  $\mu$ g NP/ml; B) 73,8 – 94  $\mu$ g NP/ml; C) 44,2 – 44,4  $\mu$ g NP/ml; D) 73,7 – 74  $\mu$ g NP/ml.



**Figura 60:** Viabilidad celular (%) de la línea celular T47D en contacto con los nanogeles vectorizados y sin vectorizar, sin o con fármaco a 6 y 10  $\mu$ M de TMX. ( $\blacktriangle$ ) NG-80.10.10.5X, ( $\times$ ) NG-80.10.10.7X, ( $\ast$ ) NG-83.7.10.5X, ( $\bullet$ ) NG-83.7.10.7X, ( $\blacklozenge$ ) células control, ( $\blacksquare$ ) TMX (tamoxifeno), NG: Nanogeles sin vectorizar; NG-F: Nanogeles vectorizados con ácido fólico. Concentración de NG sin TMX A) 44,3 – 56,4  $\mu$ g NP/ml; B) 73,8 – 94  $\mu$ g NP/ml; C) 44,2 – 44,4  $\mu$ g NP/ml; D) 73,7 – 74  $\mu$ g NP/ml.

## **6.2.- ESTUDIOS DE INTERNALIZACIÓN CELULAR (UPTAKE)**

Estos estudios tienen por finalidad demostrar si se ha producido una incorporación de las partículas en el interior celular desde donde libera el TMX mejorando la eficacia terapéutica del fármaco, debido a que el receptor de estrógenos es un receptor nuclear. La incorporación celular se puede ver influenciada por la forma, tamaño, propiedades superficiales de los sistemas, concentración de las NP en el medio, tiempo de incubación y temperatura entre otros (Kocbek, Obermajer, Cegnar, Kos, & Kristl, 2007). Por esto, es importante evaluar esta internalización con los diferentes sistemas sintetizados, ya que cada uno presenta unas características diferentes que pueden afectar a este proceso. Una de las mejoras terapéuticas propuestas en este trabajo ha sido la funcionalización de los sistemas con ácido fólico para una mayor vectorización hacia las células tumorales e intentar mejorar la incorporación de los sistemas a través de receptores de folato.

Se ha comprobado que, efectivamente, la modificación superficial de los nanosistemas con ácido fólico causa un incremento en su internalización celular. En este análisis se han seleccionado todas aquellas partículas que se han funcionalizado con fólico: las nanopartículas sintetizadas por emulsión/evaporización (con y sin fólico) y los nanogeles sintetizados por polimerización (con y sin fólico). Todos ellos se estudiaron sobre tres líneas celulares MCF7, T47D y HeLa a dos tiempos (2h y 24h). La incorporación de los sistemas se evaluó gracias a la incorporación de un fluoróforo (6-coumarina) que presenta fluorescencia a 540 nm.

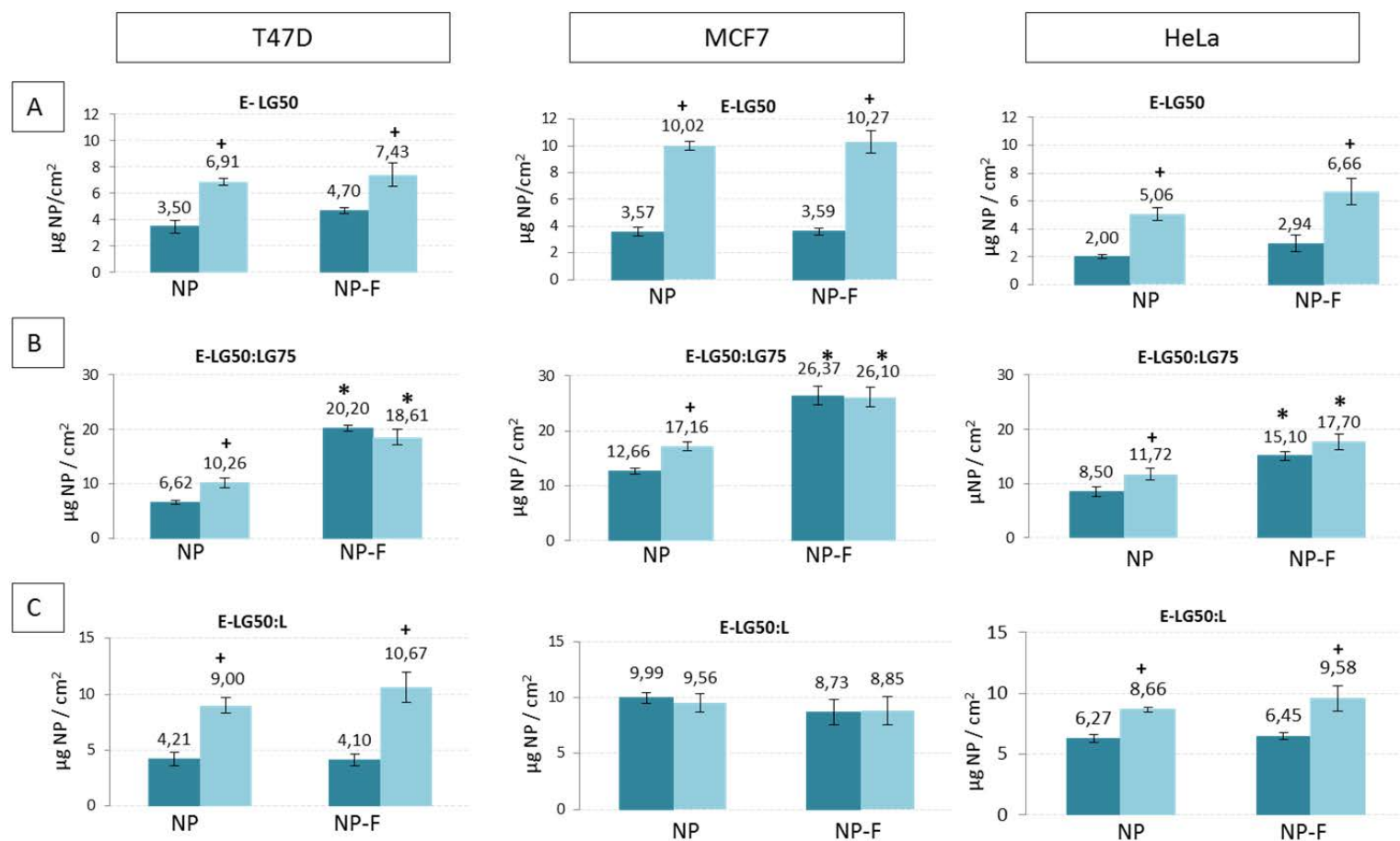
Un estudio realizado por nuestro grupo de investigación (Martinez et al., 2014), demostró, a través de la técnica de inmunofluorescencia, la expresión de los receptores de folato alfa (FR- $\alpha$ ) en las tres líneas celulares (MCF7, HeLa y T47D), siendo las células HeLa las que tenían una expresión significativamente mayor a las MCF7 y T47D, mientras que las MCF7 presentaban una expresión ligeramente superior a las T47D. Esto es relevante puesto que, el grado de expresión de los receptores por parte de las células es otro factor que puede determinar la inclusión celular junto con la cantidad de ácido fólico que recubre la partícula.

El máximo de internalización celular se observó entre las 2 h y a las 24 h. Se han obtenido diferentes resultados sobre la incorporación de los sistemas en función de la línea celular, del sistema, de la funcionalización con ácido fólico y del tiempo. Por lo general se observa que la internalización aumenta con el tiempo, con los sistemas funcionalizados con ácido fólico y en aquellas líneas celulares que expresan un mayor número de receptores de folato en la superficie.

**A) Internalización de las nanopartículas sintetizadas por emulsión/evaporación:**

Todos los sistemas presentaron incorporación celular a las 2 horas de estar en contacto las partículas con las células y, en la mayoría de los casos, esta internalización se vio aumentada a las 24 horas. Las nanopartículas más hidrofílicas (E-LG50) a las 2 horas ya presentan internalización, pero se ve aumentada a las 24 horas (*Figura 61 A*). Sin embargo no se observan grandes diferencias entre el sistema funcionalizado y sin funcionalizar, no incrementado la incorporación por la presencia de fólculo en la partícula. El sistema con una hidrofobicidad intermedia (E-LG50:LG75) (*Figura 61 B*), también presentó el máximo de incorporación a las 24 horas pero, en este caso, los sistemas con fólculo (NP-F) presentaron una mayor incorporación en las tres líneas celulares, tanto en las T47D y HeLa como en las MCF7 llegando prácticamente al máximo de incorporación a las 2 horas. El sistema más hidrofóbico (EF-LG50:L) (*Figura 61 C*) tuvo un comportamiento similar a las partículas E-LG50 incorporándose más a la 24 horas pero no habiendo diferencias entre las partículas funcionalizadas de las sin funcionalizar.

Entre los tres sistemas se observa que tiene una mayor incorporación las NP E-LG50:LG75 (tanto las funcionalizadas como las sin funcionalizar) seguidas de las E-LG50:L y después las más hidrofílicas E-LG50. De los sistemas vectorizados, la mayor inclusión celular la obtuvo con el sistema EF-LG50:LG75 en las MCF7 a las 24 horas ( $26,10 \mu\text{g NP} / \text{cm}^2$ ), mientras que el EF-LG50 presentó la menor internalización en las HeLa con  $6,66 \mu\text{g NP} / \text{cm}^2$ .



**Figura 61:** Internalización celular de las nanopartículas (NP) de poliésteres sintetizadas por emulsión con coumarina como fluoróforo **sin funcionalizar (NP)** A) E-LG50; B) E-LG50:LG75, C) E-LG75:L y **funcionalizadas con ácido fólico (NP-F)** A) EF-LG50; B) EF-LG50:LG75, C) EF-LG50:L. Resultados de tres líneas celulares (T47D, MCF7 y HeLa) a dos tiempos ■ 2h, ■ 24h. \* Diferencias significativas entre el sistema funcionalizado y sin funcionalizar al mismo tiempo y en la misma línea celular. + Diferencias significativas con la incorporación celular a las 2h del mismo sistema en la misma línea celular ( $p < 0,05$ ).

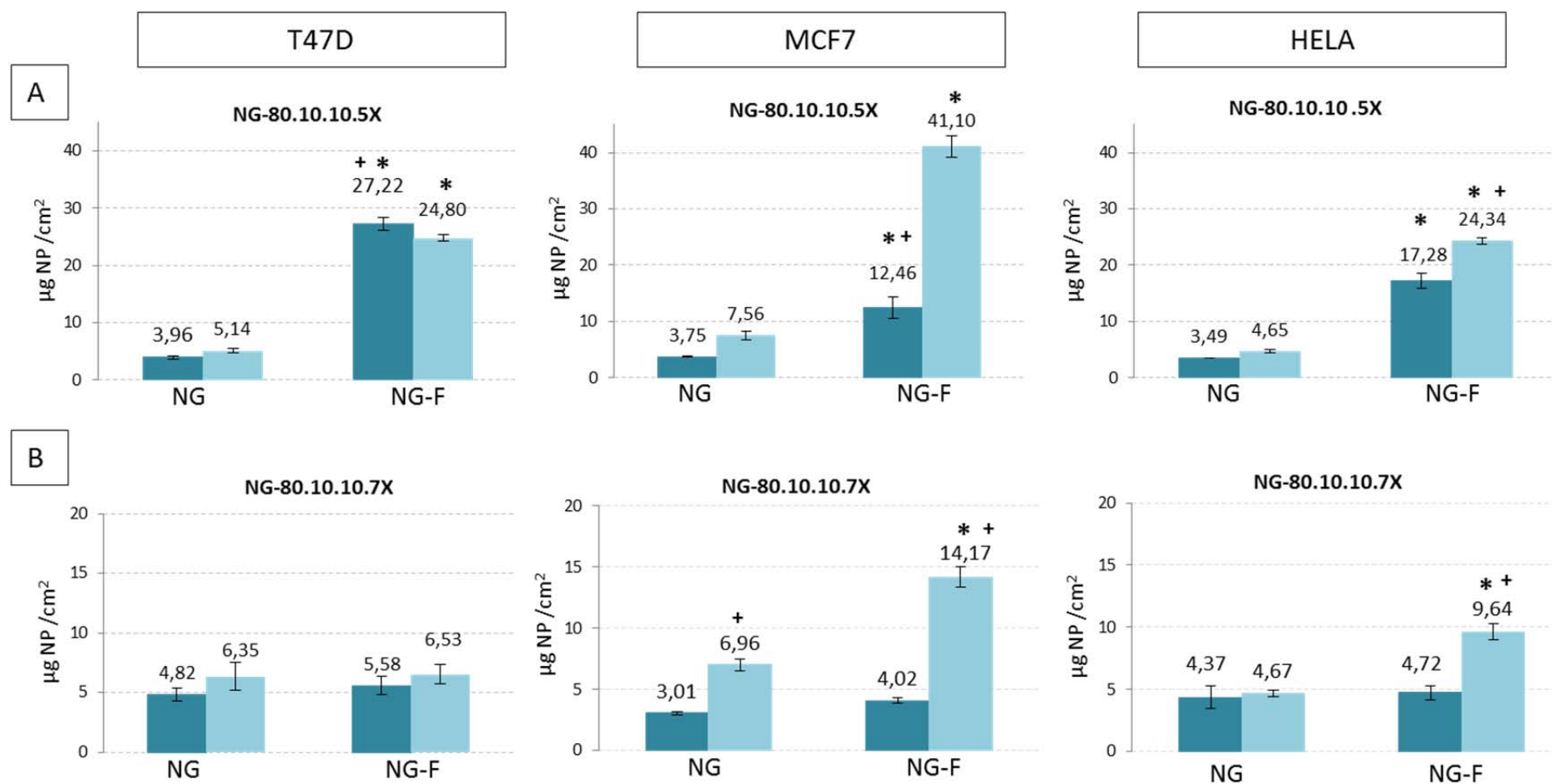


**B) Internalización nanohidrogeles sintetizados por polimerización radicalaria:**

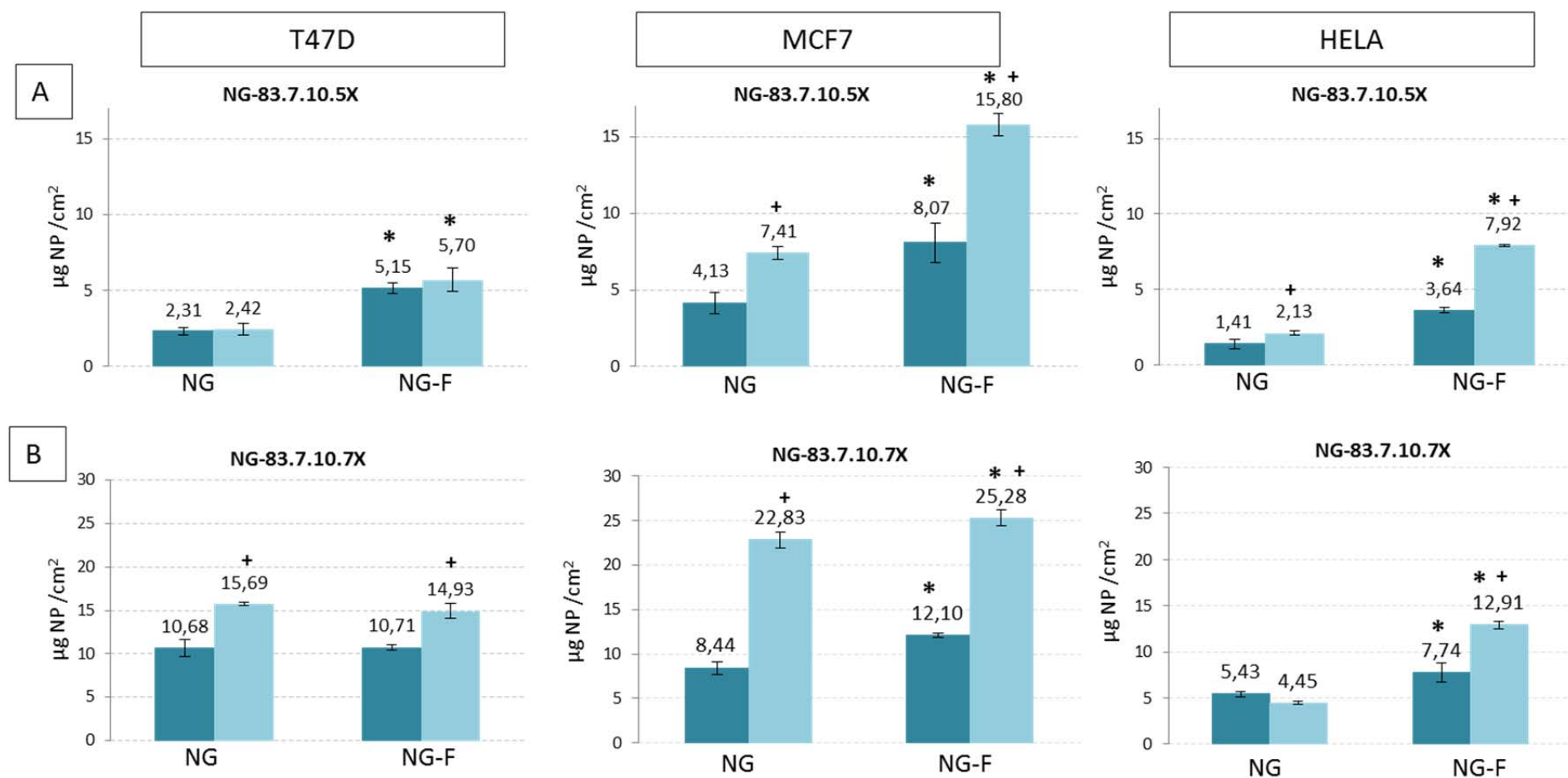
Los nanogeles al igual que las nanopartículas presentaron una incorporación celular dependiente de la línea celular, tipo de nanogel, de su funcionalización con ácido fólico y del tiempo de exposición. La máxima internalización ocurre a las 24 horas.

Los nanogeles NG-80.10.10.5X (*Figura 62 A*) incrementaron su incorporación celular a las 24 horas. El sistema funcionalizado con ácido fólico aumentó notablemente su internalización en las tres líneas celulares (tanto a las 2h como a las 24h) pasando de 5,14; 7,56 y 4,65  $\mu\text{g NP/cm}^2$  (a las 24 horas) a 24,5; 41,10 y 24,34  $\mu\text{g NP/cm}^2$  respectivamente para las líneas celulares T47D, MCF7 y HeLa. Lo mismo ocurre con el sistema NG-F-83.7.10.5X (*Figura 63 A*) que pasa de 2,42; 7,4 y 2,13  $\mu\text{g NP/cm}^2$  (NP a 24 horas) a 5,7; 15,8 y 7,92  $\mu\text{g NP/cm}^2$  (NP-F a 24 horas) para T47D, MCF7 y HeLa respectivamente. Para el caso de los sistemas con un porcentaje mayor de entrecruzante NG-80.10.10.7X y NG-83.7.10.7X se aprecia un menor incremento en la incorporación celular por la presencia de fólico en los nanogeles. Esto puede deberse por un posible leve bloqueo de los receptores debido a una pequeña liberación de fólico libre en el medio. En los sistemas con un mayor grado de entrecruzante se puede haber favorecido el atrapamiento de una pequeña cantidad de fólico en el interior, en vez de su unión al monómero 2AAECM. El fólico se ha podido encapsular en el sistema durante la funcionalización ya que se realizó post-síntesis en un medio acuoso (en el cual los hidrogeles se hincan) y el mayor grado de entrecruzamiento pudo favorecer su atrapamiento. Durante este ensayo celular, esta pequeña cantidad de fólico puede estar siendo liberado al medio. Esto se corrobora con la cuantificación del fólico incorporado (*Tabla 19*) en el cual se observó que los sistemas con un mayor grado de entrecruzante incorporaron mayor cantidad de fólico.

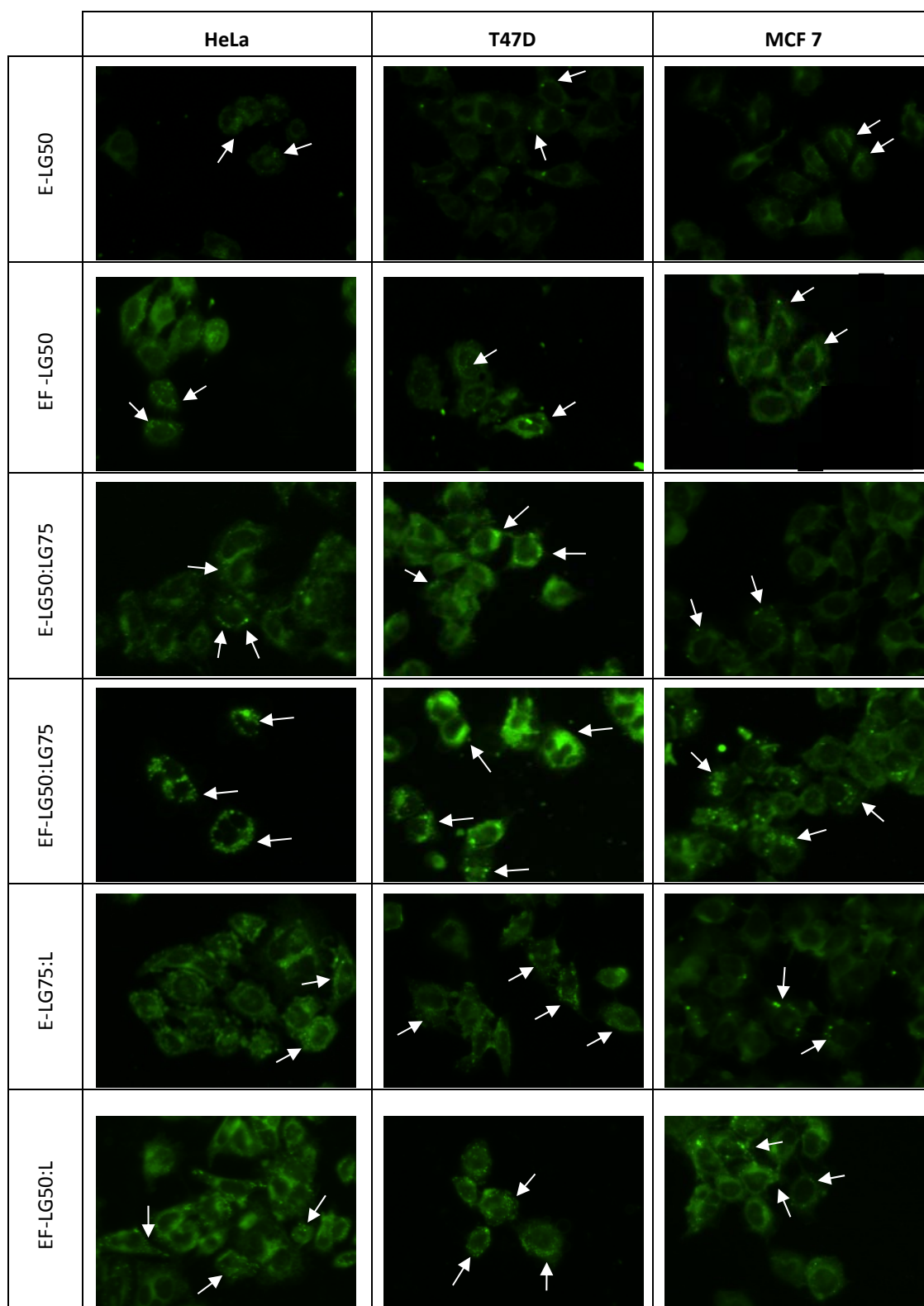
En las *Figuras 64, 65 y 66* se pueden apreciar las imágenes en las cuales se observa la internalización de los sistemas marcados con coumarina en el interior celular de las HeLa, MCF7 y T47D.



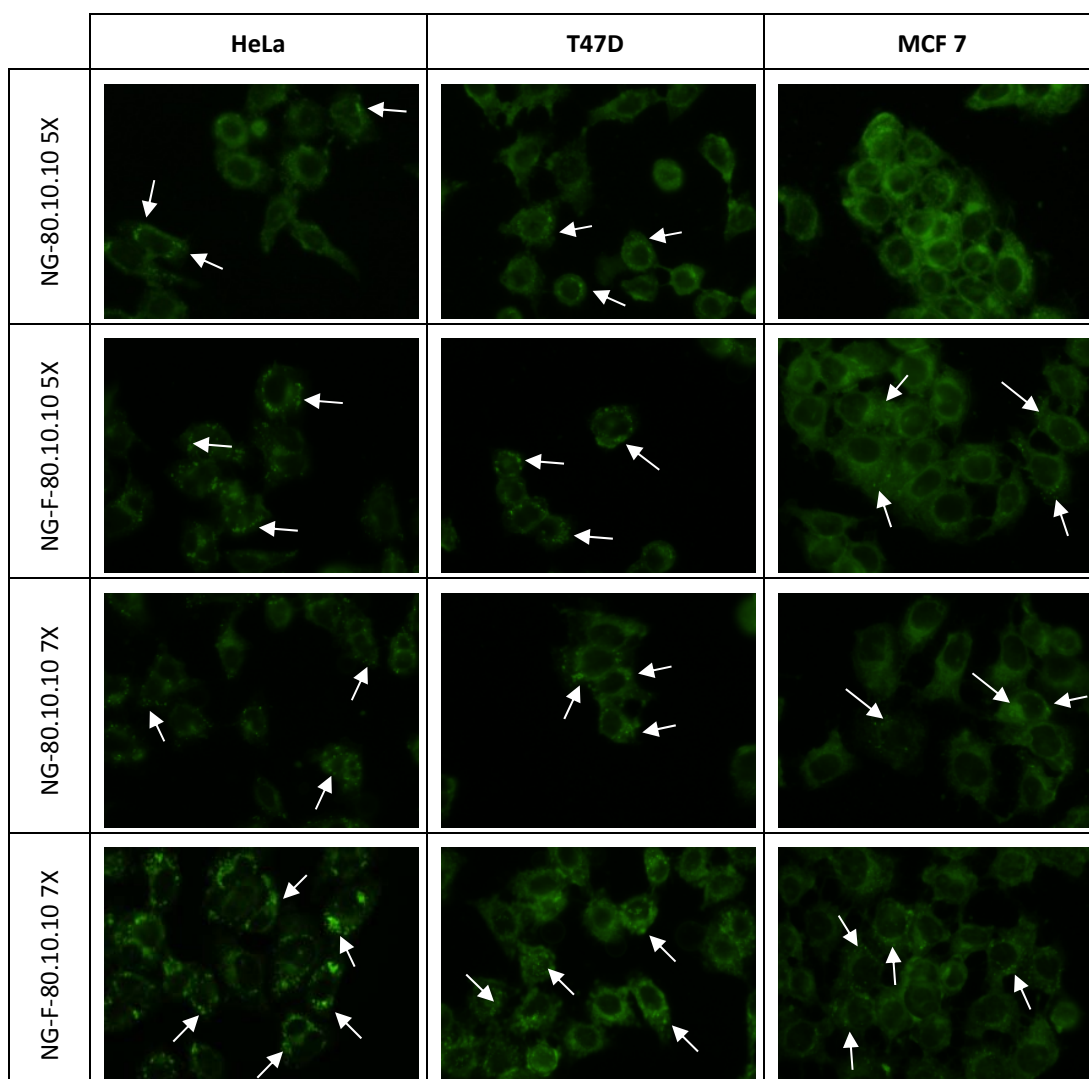
**Figura 62:** Incorporación celular de nanogeles (NG) sintetizadas por polimerización radicalaria, con coumarina como fluoróforo, **sin funcionalizar (NG)** A) NG-80.10.10.5X, y B) NG-80.10.10.7 y **funcionalizadas con ácido fólico (NG-F)**: A) NG-F-80.10.10.5X, y B) NG-F-80.10.10.7X. Resultados de tres líneas celulares (T47D, MCF7 y HeLa) a dos tiempos ■ 2h y ■ 24h. \* Diferencias significativas entre el sistema funcionalizado y sin funcionalizar al mismo tiempo y en la misma línea celular. + Diferencias significativas con la incorporación celular a las 2h del mismo sistema en la misma línea celular ( $p < 0,05$ ).



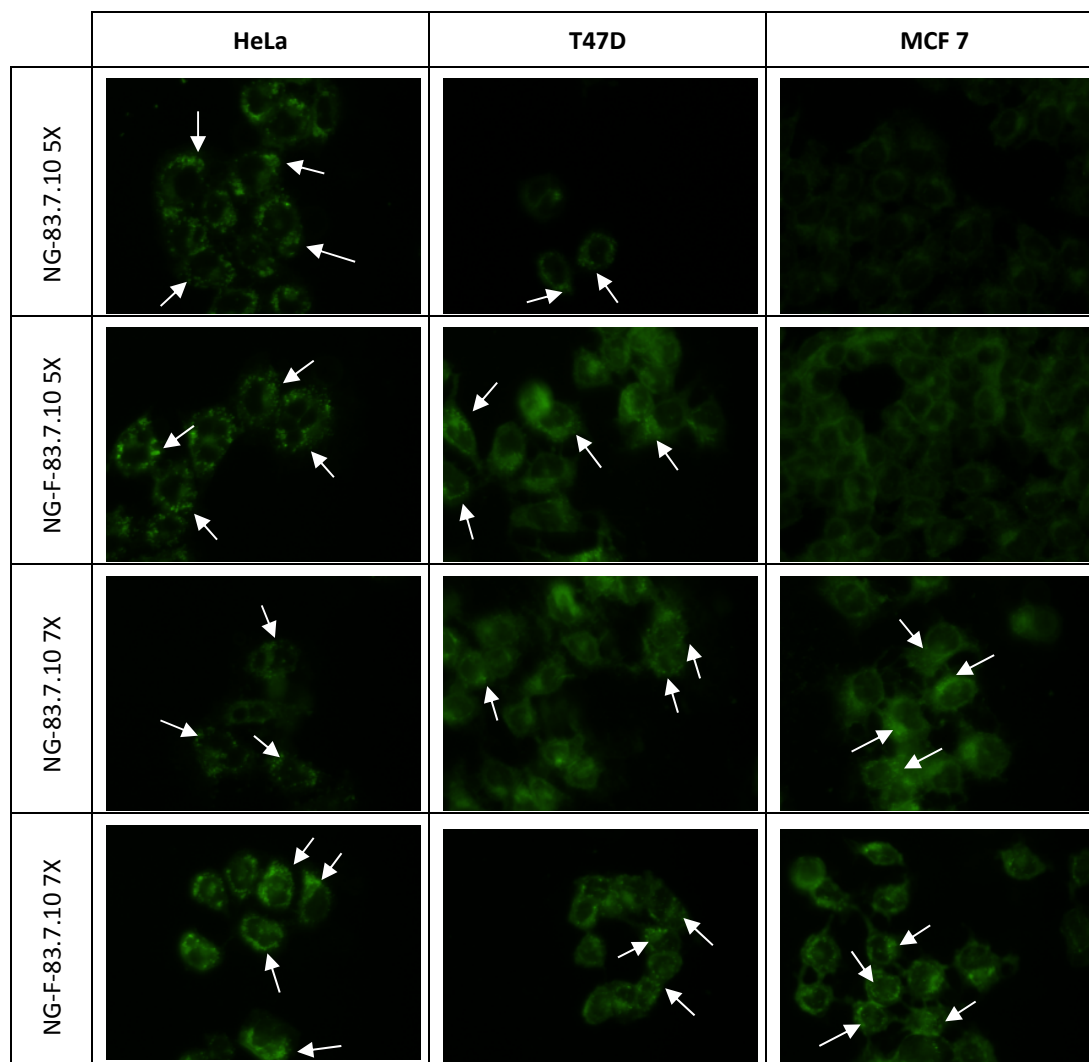
**Figura 63:** Incorporación celular de nanogeles (NG) sintetizadas por polimerización radicalaria, con coumarina como fluoróforo, *sin funcionalizar* (NG) A) NG-83.7.10.5X y B) NG-83.7.10.7X y *funcionalizadas con ácido fólico* (NG-F): A) NG-F-83.7.10.5X y B) NG-F-83.7.10.7X. Resultados de tres líneas celulares (T47D, MCF7 y HeLa) a dos tiempos ■ 2h, ■ 24h. \* Diferencias significativas entre el sistema funcionalizado y sin funcionalizar al mismo tiempo y en la misma línea celular. <sup>+</sup> Diferencias significativas con la incorporación celular a las 2h del mismo sistema en la misma línea celular ( $p < 0,05$ ).



**Figura 64:** Fotografías de la internalización celular de las nanopartículas de poliésteres sintetizadas por emulsión, NP con 6-coumarina incorporado como fluoróforo. Resultado de tres líneas celulares HeLa, T47D y MCF7. Fotografías realizadas con un microscopio de fluorescencia. **NP sin funcionalizar** E-LG50, E-LG50:LG75 y E-LG75:L y **partículas funcionalizadas con fólculo:** EF-LG50, EF-LG50:LG75 y EF-LG50:L.



**Figura 65:** Fotografías de la internalización celular de los nanogeles sintetizados por polimerización radicalaria, NG con 6-coumarina incorporado como fluoróforo. Resultados de las tres líneas celulares HeLa, T47D y MCF7. Fotografías realizadas con un microscopio de fluorescencia. **NG sin funcionalizar:** NG-80.10.10.5X y NG-80.10.10.7X, **NG funcionalizados con fólculo:** NG-F-80.10.10.5X y NG-F-80.10.10.7X.



**Figura 66:** Fotografías de la internalización celular de los nanogeles sintetizados por polimerización radicalaria, NG con 6-coumarina incorporado como fluoróforo. Resultados de las tres líneas celulares HeLa, T47D y MCF7. Fotografías realizadas con un microscopio de fluorescencia. **NG sin funcionalizar:** NG-83.7.10.5X y NG-83.7.10.7X; **NG funcionalizados con fólico:** NG-F-83.7.10.5X y NG-F-83.7.10.7X.

### **6.2.1.- INHIBICIÓN CON FÓLICO:**

Los resultados obtenidos y expuestos anteriormente sobre la incorporación celular demuestran que las partículas funcionalizadas con ácido fólico aumentaron su eficiencia de incorporación prácticamente todos los sistemas y líneas celulares. Este ensayo de inhibición con fólico se realizó con la finalidad de determinar que el mecanismo de incorporación celular era llevado a cabo a través de receptores de fólico y no otro mecanismo independiente de receptor.

Este ensayo se ha llevado a cabo poniendo en contacto con las células con ácido fólico libre en el medio de cultivo a una concentración de 1 mM durante 2 horas antes de añadir las partículas. Las partículas funcionalizadas se añadieron a continuación resuspendidas en el medio de cultivo con 1 mM de ácido fólico libre. De esta forma, los receptores de folato se saturan por el fólico libre y quedan bloqueados para ser usados por las partículas e incorporarse al interior celular, disminuyéndose la inclusión celular.

#### **A) Internalización de las nanopartículas sintetizadas por emulsión/evaporación:**

Se observa que las nanopartículas EF-LG50 funcionalizadas presenta la misma incorporación en las tres líneas celulares T47D, MCF7 y HeLa cuando los receptores de folato se bloquearon con ácido fólico libre en el medio (*Figura 67*). Como ya se ha observado y comentado en los estudios anteriores de incorporación este sistema no presentará un incremento en la incorporación celular cuando se funcionalizaron con fólico en estas líneas celulares.

En el sistema EF-LG50:LG75 presentó una disminución en la incorporación celular de los sistemas funcionalizados cuando los receptores se bloquearon, en las tres líneas celulares analizadas. Este bloqueo hacía que la incorporación pasase de 15,10; 26,37 y 20,20  $\mu\text{g NP/cm}^2$  a 5,39; 10,8 y 7,48  $\mu\text{g NP/cm}^2$  en HeLa, MCF7 y T47D respectivamente.

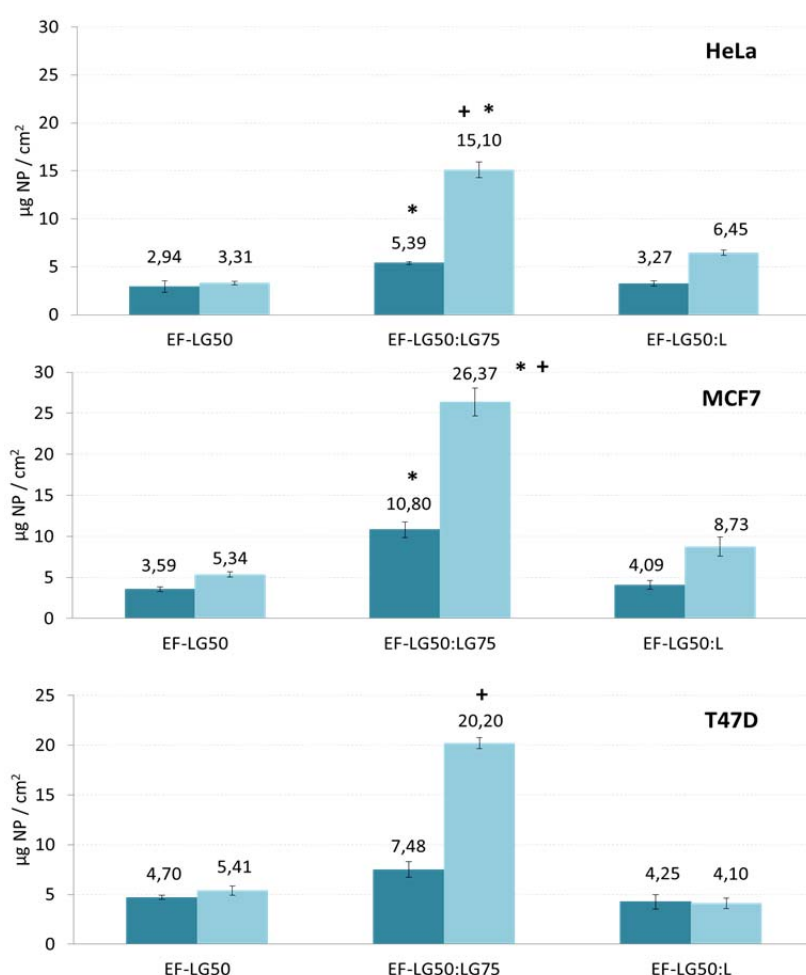
El sistemas más hidrofóbico EF-LG50:L, el bloqueo de los receptores produce un incremento en su internalización en las líneas celulares MCF7 y HeLa pero no parece ejercer ningún efecto en las T47D permaneciendo la misma internalización 4,1 – 4,2  $\mu\text{g NP/cm}^2$ .

### Internalización nanohidrogeles sintetizados por polimerización radicalaria:

En todos los casos se produjo una pequeña disminución en la incorporación celular cuando se provocó la inhibición de los receptores excepto en el caso del sistema NG-F-80.10.10.7X en la línea celular HeLa (Figura 68).

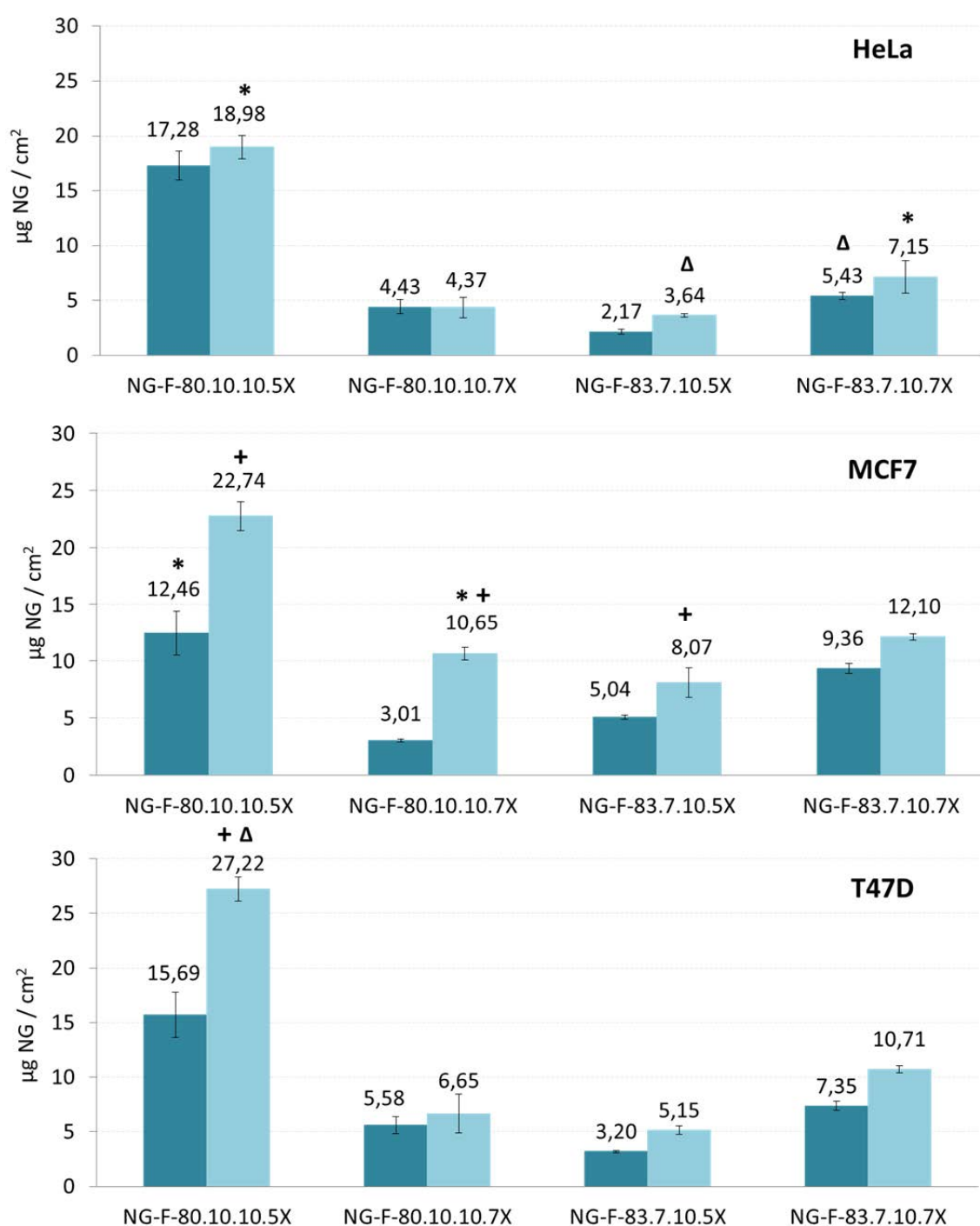
En el caso de las células HeLa, la diferencia entre la internalización con los receptores bloqueados y sin bloquear fue menor que en las otras dos líneas celulares (MCF7 y T47D).

El sistema que aparentemente le afecta más el bloqueo de los receptores de fólico es el NG-F-80.10.10.5X ya que pasa de una internalización de 22,74 y 27,22  $\mu\text{g NP}/\text{cm}^2$  en las líneas MCF7 y T47D respectivamente a 12,48 y 15,69  $\mu\text{g NP}/\text{cm}^2$ .



**Figura 67:** Incorporación celular de nanopartículas sintetizadas por emulsión/evaporación (NP) nanopartículas sin funcionalizar y (NP-F) funcionalizadas con ácido fólico. Comparativa entre la incorporación sin bloquear los receptores (■) y previa inhibición de los receptores de folato (□). + Diferencias significativas entre el sistema en la misma línea celular con los receptores de fólico sin inhibir e inhibidos. \* Diferencias significativas entre el sistema en las mismas condiciones con el resto de líneas celulares ( $p < 0,05$ ).





**Figura 68:** Incorporación celular de los nanohidrogeles sintetizados por polimerización funcionalizados con ácido fólico (NG-F). Comparativa entre la incorporación sin bloquear los receptores (■) y previa inhibición de los receptores de folato (■).

+ Diferencias significativas entre el sistema en la misma línea celular con los receptores de fólico sin inhibir e inhibidos. \* Diferencias significativas entre el sistema en las mismas condiciones con el resto de líneas celulares. Δ Diferencias significativas entre el sistema en las mismas condiciones con la líneas celular MCF7 ( $p < 0,05$ ).

## **7.- CARACTERIZACIÓN *IN VIVO***

En este punto una vez evaluadas las características físico-químicas de las partículas así como su comportamiento en la liberación del fármaco en condiciones *in vitro* se seleccionaron tres de las partículas sintetizadas por atomización y secado (spray-dryer) para realizar un estudio de biocompatibilidad *in vivo*, puesto que resultaron ser los sistemas que controlaron la liberación durante un periodo de tiempo más largo. Las partículas seleccionadas fueron S-LG50-TMX; S-LG50:LG75-TMX y S-LG75:L-TMX.

En este estudio se analizó las concentraciones plasmáticas de TMX alcanzadas tras su liberación *in vivo*, así como la de uno de sus metabolitos 4OH-TMX. Se realizó el estudio farmacocinético con los datos de concentración plasmática de TMX y de su metabolito, se valoró el índice organosomático, la biodistribución del TMX y 4OH-TMX en los órganos así como el posible daño que haya podido causar su acumulación a través de estudios histológicos y parámetros bioquímicos. También se estudió la biocompatibilidad de las partículas en el lugar de inyección.

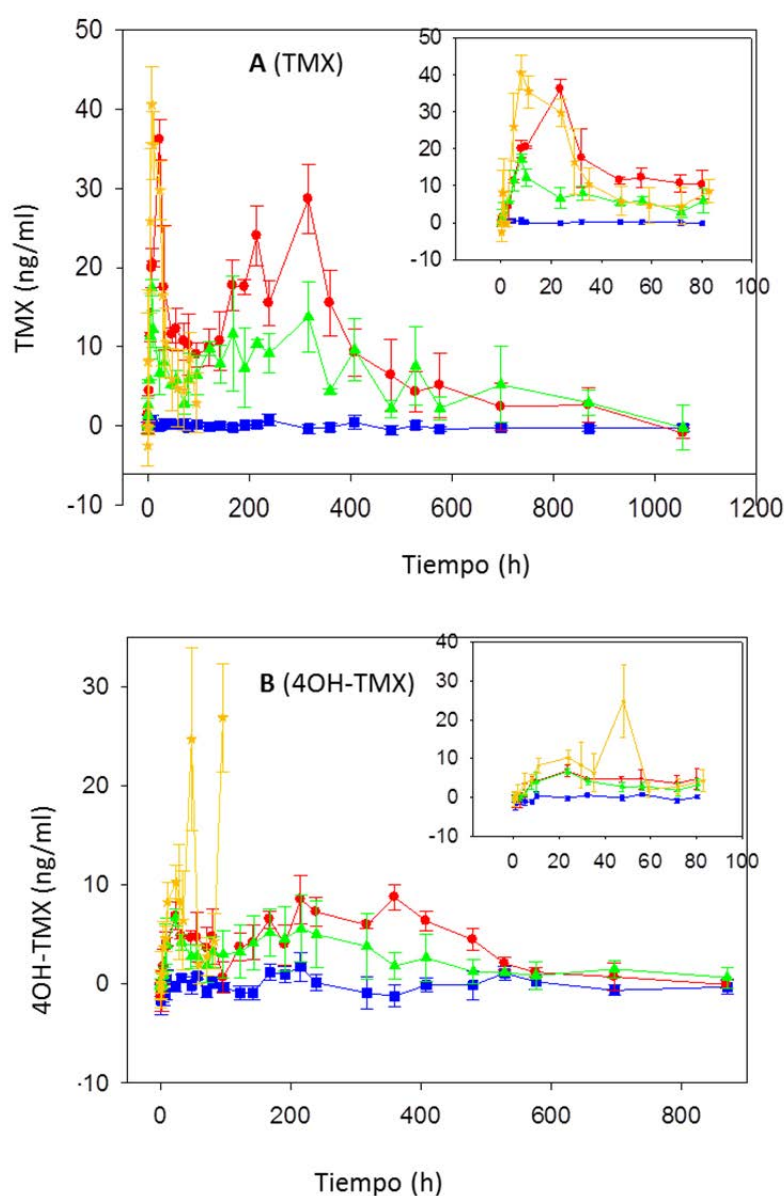
Las partículas resuspendidas en suero fisiológico fueron inyectadas en el lomo de ratas Wistar hembras en cantidad adecuada para suministrar una dosis de TMX de 11 mg de TMX / kg de rata. Teniendo en cuenta la carga de fármaco de las partículas, esta dosis equivale a 93,94 mg S-LG50:LG75 MS/rata, 94 mg S-LGA50 MS/rata and 127,54 mg S-LGA75:L MS/ rata. Estas partículas quedaron depositadas a nivel subdérmico desde donde fueron liberando el fármaco a medida que se iban degradando durante dos meses. Los resultados obtenidos *in vivo* tienen concordancia con los resultados obtenidos en la liberación *in vitro*. Se administró también una dosis igual de TMX en disolución a otro grupo, y otro conjunto de ratas constituyó el grupo control y por lo tanto no se les hizo ningún tratamiento.

### **7.1.- CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS ALCANZADAS TRAS LA LIBERACIÓN *IN VIVO***

La liberación más rápida se obtuvo con el sistema S-LG50-TMX alcanzando en 8 horas concentraciones de TMX de  $17 \pm 1$  ng TMX/ml y en 11 h,  $6,7 \pm 1,4$  ng 4OH-TMX/ml del metabolito. El sistema S-LG50:LG75-TMX generó mayores concentraciones de TMX ( $36,14 \pm 2,5$  ng TMX/ml) y 4OH-TMX ( $8,5 \pm 2,4$  ng 4OH-TMX/ml), pero en un periodo de tiempo más prolongado (23,5 horas y 215 horas respectivamente) (Figura 69). De esta forma, este segundo sistema, produjo concentraciones plasmáticas del fármaco y su metabolito 1,3 veces

superiores al S-LG50-TMX. El tercer sistema evaluado (S-LG75:L-TMX) genera una liberación muy lenta de TMX por lo que las concentraciones plasmáticas, tanto de TMX como de 4OH-TMX, estuvieron por debajo del límite de detección de la técnica de HPLC.

Para el caso del TMX administrado en disolución a una dosis de 11 mg TMX/kg rata, no se detectaron concentraciones plasmáticas al 4º día después de la administración, pero las concentraciones alcanzadas fueron superiores (40 ng/ml en 8 horas para TMX y 24,69 ng/ml en 48 horas para 4OH-TMX) a las conseguidas con los sistemas.



**Figura 69:** Concentraciones plasmáticas de TMX (A) y 4OH-TMX (B) tras la administración subcutánea de microesferas basadas en poliésteres alifáticos sintetizadas por Atomización y secado (spray dryer). Inserto: Concentraciones plasmáticas de TMX and 4OH-TMX en la primera etapa. ▲ S-LG50; ● S-LG75:L; × TMX en solución.

## 7.2.- ESTUDIO FARMACOCINÉTICO

En el estudio no-compartimental realizado sobre las curvas de concentración plasmática, se han obtenido diferencias significativas entre las MS-TMX y el TMX en disolución. El área bajo la curva versus tiempo ( $AUMC_0^\infty$ ) y el tiempo de residencia medio (MRT) se ven aumentados significativamente en el TMX y 4OH-TMX cuando el fármaco fue administrado con los sistemas particulados (MS-TMX) (Tabla 35). El MRT aumentó entre 12 y 9 veces y el  $AUMC_0^\infty$  4,4 y 5,9 para el TMX y 4OH-TMX respectivamente lo que demuestra que se incrementa el tiempo de permanencia del fármaco en el organismo con los sistemas poliméricos.

La relación del  $AUC_0^\infty$  del 4OH-TMX / TMX (MR) no se vio modificado por la administración de estos sistemas lo que indica que el metabolismo del fármaco no se ven alterado. Sin embargo la velocidad de eliminación se ve muy ralentizada al ser administrado a través de los sistemas.

El TMX incluido en los sistemas, tanto en las S-LG50 como en las S-LG75:L, presentan una biodisponibilidad mucho mayor (26 %) que la del el tamoxifeno administrado en disolución (4,3%). Este parámetro expresa la fracción de fármaco que alcanza circulación sistémica y estos resultados indican que se consigue incrementar la porción de fármaco en plasma a pesar de que la concentración plasmática sea inferior con los sistemas, debido al periodo de tiempo en el que se encuentra en circulación. A esto se le suma que la constante de eliminación se ve claramente disminuida ( $0,005 - 0,002 \text{ h}^{-1}$  para el TMX y  $0,008 - 0,005 \text{ h}^{-1}$  para el 4OH-TMX) reduciendo la velocidad en la que el fármaco es eliminado y como consecuencia el aclaramiento.

**Tabla 35:** Parámetros farmacocinéticos calculados a partir de las concentraciones plasmáticas alcanzadas durante la liberación (Figura 69)

Sistemas	TMX								
	Cmax (ng/ml)	Tiempo (horas)	$AUC_0^\infty$ (μg*h/ml)	$AUMC_0^\infty$ (μg*h <sup>2</sup> /ml)	Ke (h <sup>-1</sup> )	AB %	RB %	MRT (h)	
S-LG50-TMX	36,14 ± 2,5 <sup>b</sup>	23,5	9,15 ± 2,99	3121,6 ± 1523,4	0,005 ± 0,0017	25,97 ± 3,8	64,9 ± 11,8	315,7 ± 53,9	
S-LG50:LG75-TMX	17 ± 1	8,05	9,36 ± 4,3	4151,9 ± 2023,6	0,002 ± 0,0001	26,3 ± 6,4	66 ± 18,2	427,1 ± 31,9 <sup>a</sup>	
TMX disolución s.c.	40,57± 4,7 <sup>b</sup>	8	1,55 ± 0,5 <sup>a,b</sup>	56,7±28,2 <sup>b</sup>	0,055 ± 0,01 <sup>a,b</sup>	4,39 ± 0,64 <sup>a,b</sup>	-	34,7 ±2,5 <sup>a,b</sup>	
TMX disolución i.v. (2,8 mg/kg)	235	-	4,85 ± 0,57	150 ± 32 <sup>b</sup>	-	-	-	31 ± 3 <sup>a,b</sup>	
Sistemas	4OH-TMX								
	Cmax (ng/ml)	Tiempo (horas)	$AUC_0^\infty$ (μg*h/ml)	$AUMC_0^\infty$ (μg*h <sup>2</sup> /ml)	Ke (h <sup>-1</sup> )	AB %	RB %	MRT (h)	MR
S-LG50-TMX	8,5 ± 2,4	215	3,3 ± 0,7	1008,9 ±219,1	0,0085 ±0,0015	26,7 ± 3,3	23,2 ± 3,5	302,7 ±4,05	0,37 ± 0,03
S-LG50:LG75-TMX	6,7 ± 1,4	11	4,06 ± 1,07	1153,1±799,8	0,0055 ±0,0033	32,9 ± 5,2	28,1 ± 3	363,6 ±118,8	0,46 ± 0,08
TMX disolución s.c.	24,7 ± 9,4 <sup>a,b</sup>	48	0,75 ± 0,3 <sup>a,b</sup>	27,3±13 <sup>a,b</sup>	0,09±0,03 <sup>a,b</sup>	6,05 ± 1,5 <sup>a,b</sup>	-	34,7±2,5 <sup>a,b</sup>	0,47 ± 0,02
TMX disolución i.v. (2,8 mg/kg)	65	0,5	1,72 ± 0,05 <sup>b</sup>	55 ± 6 <sup>a,b</sup>	-	-	-	32 ± 2 <sup>a,b</sup>	0,36

Cmax: concentración máxima alcanzada,  $AUC_0^\infty$ : Área bajo la curva de concentraciones plasmáticas versus tiempo en el momento,  $AUMC_0^\infty$  Área bajo la curva de concentración plasmática versus tiempo en el primer momento, Ke: constante de eliminación, MRT: tiempo medio de residencia, AB: biodisponibilidad absoluta, RB: biodisponibilidad relativa, MR: relación del  $AUC_0^\infty$  de los metabolitos.

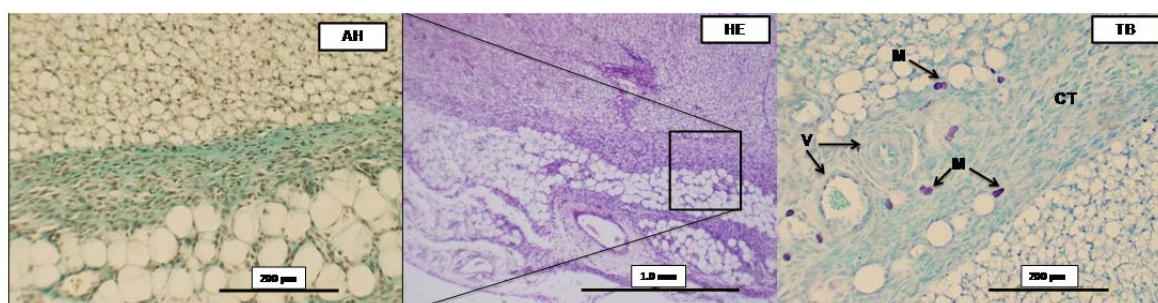
a: Diferencias estadísticamente significativas con el sistema S-LG50 ( $p < 0,05$ )

b: Diferencias estadísticamente significativas con el sistema S-LG50:LG75 ( $p < 0,05$ )

### 7.3.- BIOCOMPATIBILIDAD DE LOS SISTEMAS; HISTOLOGÍA EN EL LUGAR DE INYECCIÓN

Se realizó un estudio histológico en el lugar de inyección con el fin de valorar la biocompatibilidad de los sistemas administrados.

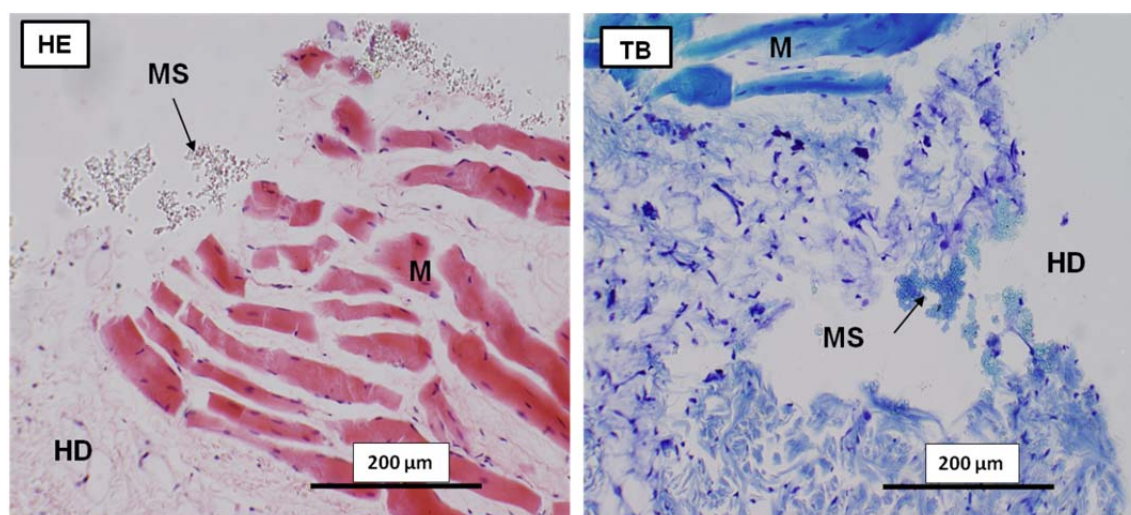
Cuando el TMX fue administrado en disolución se formó un granuloma rodeado de tejido conectivo y tejido adiposo en el lomo de la rata. Presentó vascularización y mastocitos liberando histamina (*Figura 70*).



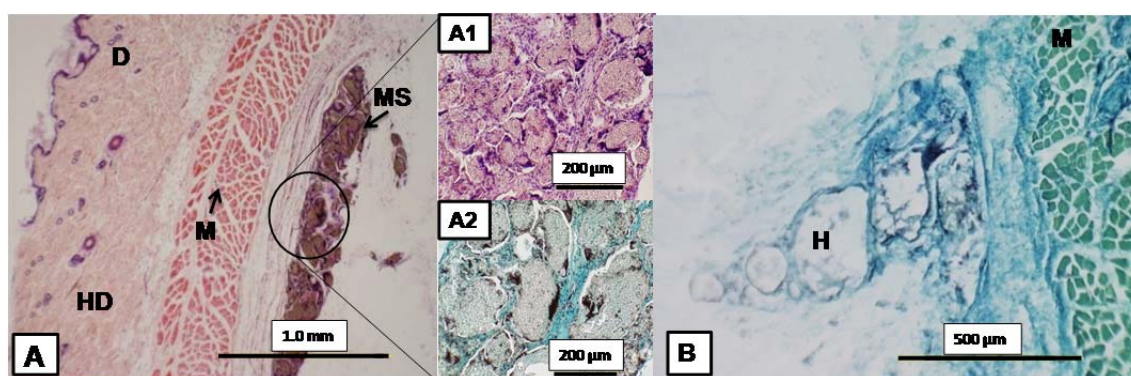
**Figura 70:** Granuloma formado cuando el TMX en solución fue administrado subcutáneamente. M: macrófago; V: vaso sanguíneo; CT: tejido conectivo. Tinción tricrómico (AH), tinción de azul de toluidina (TB) y tinción de hematoxilina-eosina (HE).

Cuando en fármaco fue administrado por los sistemas poliméricos no se formó dicho granuloma ni capsula fibrosa alrededor de las partículas (*Figura 71*). Sin embargo sí que se observaron pequeñas agrupaciones de partículas y restos de partículas diseminadas por el tejido lo que confirma la biocompatibilidad de los sistemas. En el caso del sistema hidrofóbico S-LG75:L (*Figura 72*) se encontraron grandes acumulaciones de partículas debajo de la capa muscular pero sin llegar a formar esa capsula fibrosa o granuloma, tampoco se observaron linfocitos ni mastocitos aunque sí que se observaron células gigantes de cuerpo extraño con capacidad macrófaga (*Figura 72 A*) lo que significa que las sistemas no hay desencadenado un rechazo. Este resultado está en concordancia con la liberación *in vivo*, ya que la liberación desde las micropartículas S-LG75:L fue tan pequeña que no se detectó debido a su lenta degradación y por ello permanecen todavía subcutáneamente.





**Figura 71:** Histologías de la piel de animales tratados con microesferas sin fármaco (S-LG50) HD: hipodermis; M: capa muscular; MS: masa de microesferas. HE: tinción hematoxilina - eosina y TB: tinción de azul de toluidina.

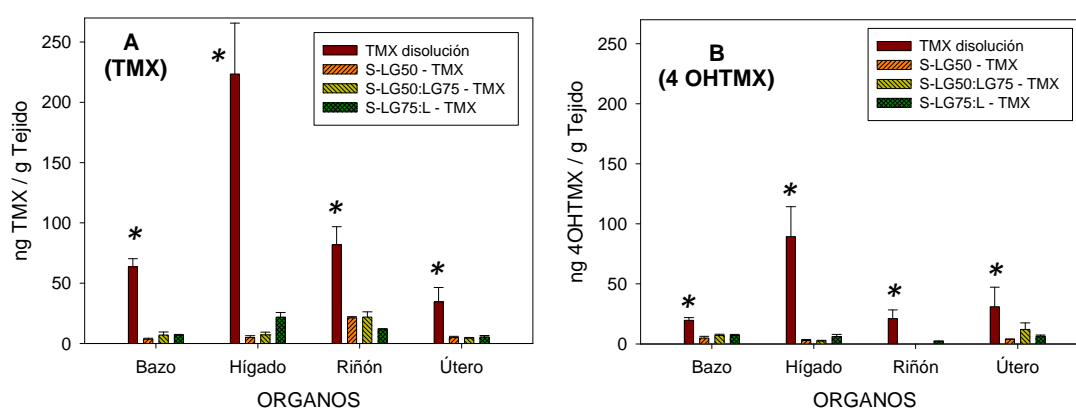


**Figura 72:** A) Histologías de la piel de animales tratados con S-LG75:L sin TMX (A1: Tinción de hematoxilina-eosina, HE y A2: tinción tricrómico). D: Dermis; HD: hipodermis; M: capa muscular; MS: masa de microesferas; B) histología de la piel de los animales tratados con S-LG75:L con TMX (tinción tricrómico). M: capa muscular; H: cavidades dejadas por MS después de su biodegradación.

#### 7.4.- BIODISTRIBUCIÓN:

Una vez que se administra el fármaco o desde que se libera de los sistemas en el interior del organismo, se moviliza por todo el cuerpo llegando a las zonas a las que puede acceder. Hay diversos factores que influyen en la biodistribución de los fármacos como: sus propiedades fisicoquímicas, unión a las proteínas plasmáticas, afinidad del fármaco por los tejidos, el flujo sanguíneo de la zona, y la permeabilidad de las membranas a atravesar. La

biodistribución del TMX (Figura 73 A) y su metabolito 4OH-TMX (Figura 73 B) cambió cuando se administró con los sistemas poliméricos. El fármaco administrado en disolución se acumuló fundamentalmente en el hígado, seguido del riñón, bazo y útero, mientras que cuando se administró con las MS se acumuló mayoritariamente el riñón seguido del hígado, bazo y útero, exceptuando el caso del sistema S-LG75:L-TMX. En todos los casos cuando el fármaco se administró con las MS su concentración en todos los órganos disminuyó significativamente.

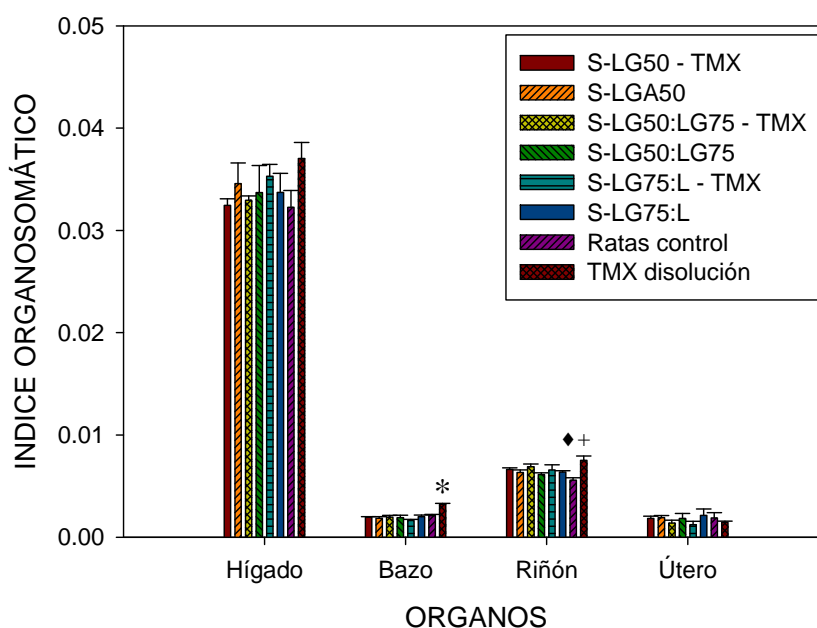


**Figura 73:** Cantidad de TMX (A) y 4OH-TMX (B) acumulado en distintos órganos: bazo, hígado, riñón, y útero debido a la administración de TMX mediante microesferas sintetizadas por atomización y secado (spray dryer). S-LG50-TMX (■); S-LG50:LG75-TMX (■); S-LG75:L-TMX (■) y TMX en disolución (■). \*Diferencias significativas entre TMX en solución y microesferas con TMX incorporado ( $p < 0,05$ ).

## 7.5.- INDICE ORGANOSOMÁTICO (IOS)

El cálculo de los coeficientes de los órganos puede corroborar alguno de los resultados obtenidos por el estudio histológico, ya que órganos hipertrofiados, dañados, o con una afección tumoral suelen incrementar su peso. Entre los distintos grupos de tratamiento *in vivo* se han encontrado diferencias significativas especialmente en el riñón. Los IOS del riñón de las ratas control fueron significativamente diferentes comparado con todos los grupos a los cuales se le administró TMX (MS-TMX y TMX en disolución) pero no presentó diferencias comparados con los grupos a los cuales se le administró las MS sin Fármaco. En el caso del bazo presentó un IOS mayor solo cuando el TMX se administró en disolución. En el hígado y útero no se observaron diferencias significativas en cuanto a su IOS (Figura 74).





**Figura 74:** Índice organosomático del hígado, bazo, riñón y útero procedentes de ratas tratadas con microesferas elaboradas mediante atomización y secado, con y sin TMX, disolución de TMX y ratas sin ningún tratamiento (ratas blanco). (\*) Diferencias significativas entre TMX en disolución y los demás tratamientos incluidos las ratas ( $p < 0,05$ ). (♦) Diferencias significativas con todos los tratamientos con TMX ( $p < 0,05$ ). (+) Diferencias significativas con los tratamientos sin TMX incluidas las ratas control ( $p < 0,05$ ).

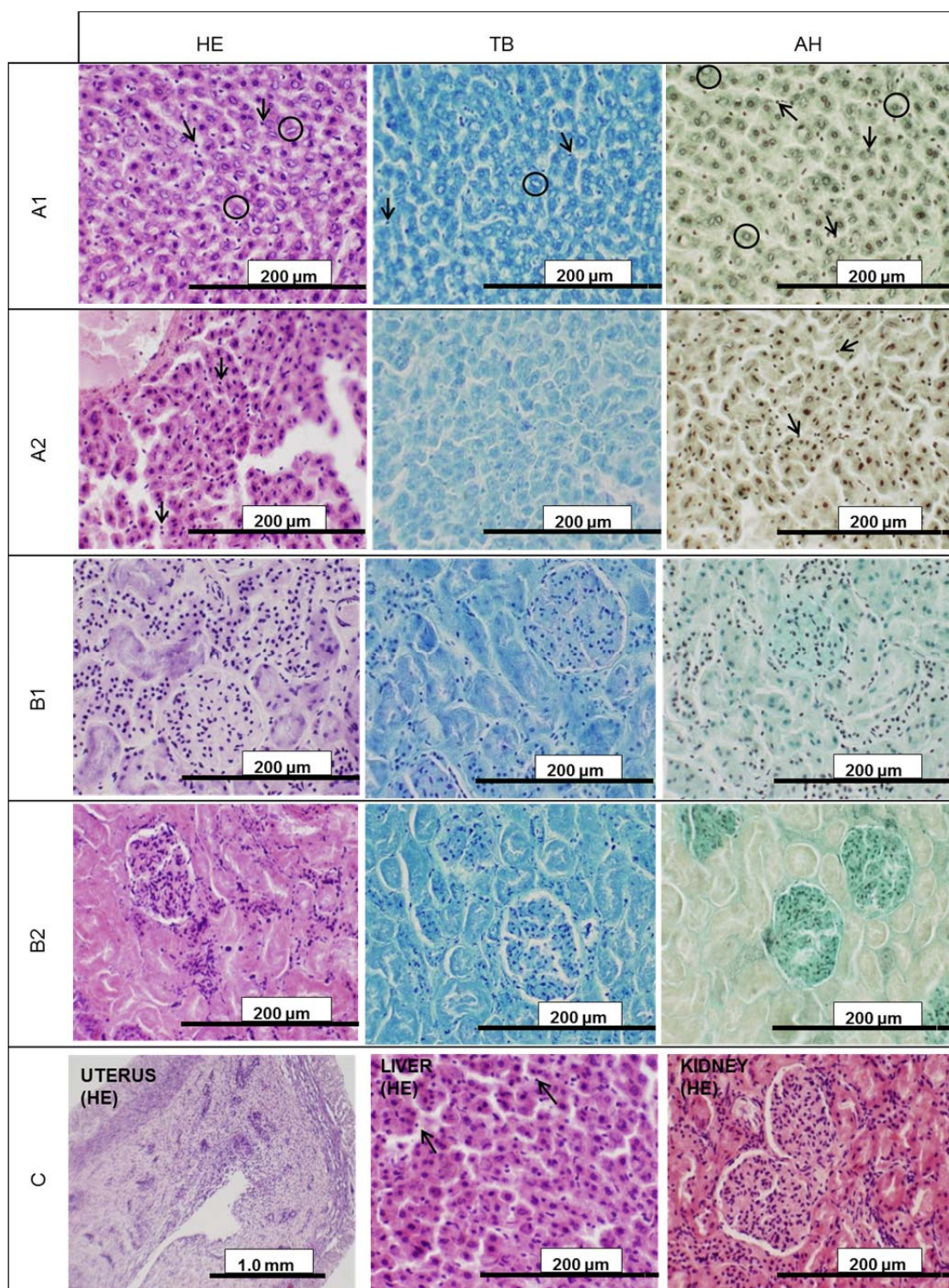
## 7.6.- ESTUDIO HISTOLÓGICO EN LOS ÓRGANOS

A pesar de que la liberación controlada del fármaco desde las MS disminuye significativamente la acumulación del fármaco y su metabolito en los órganos no diana se ha detectado que todavía se acumula una pequeña cantidad. Con el fin de valorar si dicha acumulación es capaz de dañar a los órganos (hígado, bazo, riñón y útero) se ha realizado un estudio histológico de cada uno de ellos para evaluar su estado (Figura 75).

En los hígados, los hepatocitos de las ratas tratadas con MS-TMX presentaron núcleos menos picnóticos y pequeños cambios en la integridad celular. En todos los casos se encontraron células de kupffer con función macrofágica. Otros parámetros como aspartato amino transferasa (AST/GOT) y la alanina amino transferasa (ALT/GOT) fueron evaluados en plasma como indicadores del estado fisiológico del hígado (Anexo IV). Estos valores no se vieron significativamente aumentados en las ratas tratadas con MS-TMX. Sin embargo, los

hepatocitos de los animales tratados con TMX en disolución no presentaron ningún cambio significativo.

Un daño significativo se observó en los riñones de las ratas tratadas con TMX en disolución, presentó una desorganización a nivel del córtex afectando tanto a los túbulo distales como proximales y al glomérulo. Este daño no fue tan evidente en los riñones de las ratas tratadas con TMX-MS, deduciéndose un menor deterioro. En este órgano tampoco se observó en ningún caso infiltrados de linfocitos. Otros parámetros bioquímicos fueron determinados para confirmar un daño a nivel funcional (*Anexo IV*), de esta forma se determinó la actividad de la aspartato aminotransferasa (AST/GOT) y alanina aminotransferasa (ALT/GPT) como biomarcadores de la filtración glomerular y función renal pero no se vieron significativamente alterados. El lactato deshidrogenasa (LDH) y la creatina (CRT) (parámetros renales) se mantuvieron en un rango normal durante todo el experimental. Sí que se observó un aumento significativo de los valores de LDH en las ratas tratadas con TMX en disolución indicando una posible lesión en este grupo.



**Figura 75:** Fotografías histológicas. **A** tejido hepático: A1. Hígado de ratas tratadas con S-PL50-TMX; A2. Hígado de ratas tratadas con TMX en solución. **B** tejido renal: B1. riñón de ratas tratadas con S-PL50-TMX; B2. Riñón de ratas tratadas con TMX en solución. **G**: glomérulo. **C** órganos procedentes de las ratas blanco (ratas sin ningún tratamiento).

HE: tinción de hematoxilina-eosina; TB: tinción azul de toluidina; AH: tinción de tricrómico.

## **DISCUSIÓN**



A continuación se va a proceder a hacer una discusión por sistema sintetizados, englobado así todos los resultados obtenido por sistema.

## **1.- MICROPARTÍCULAS BASADAS EN POLIÉSTERES SINTETIZADAS POR ATOMIZACIÓN Y SECADO (SPRAY DRYER)**

Mediante la técnica de atomización y secado se obtuvieron 10 síntesis con la siguiente composición polimérica (*Anexo I*):

- PLGA 50/50 (100%)	S-LG50
- PLGA 75/25 (100%)	S-LG75
- PLGA50/50(50%)+PLGA75/25(50%)	S-LG50:LG75
- PLA(25%)+PLGA50/50(75%)	S-LG50:L
- PLA(25%)+PLGA75/25(75%)	S-LG75:L

Los polímeros seleccionados para estos sistemas fueron los poli ésteres alifáticos (PLGA y PLA) debido a su gran biocompatibilidad y versatilidad, por lo cual ya han sido utilizados para diversas aplicaciones médicas, y además sus características físico-químicas, les permite ser sometidos a la técnica de atomización y secado. Las características de los copolímeros poli (D,L Láctico-co-glicólico) (PLGA), usados como material controlador de la liberación del fármaco en las micropartículas, provienen de sus monómeros. El polímero poli (ácido glicólico) (PGA), un poliéster alifático con la cadena lineal más simple, con una morfología cristalina. Sin embargo el poli (ácido láctico) (PLA) es semicristalino en sus estados ópticamente activos (forma D o forma L), pero en sus estados ópticamente inactivos, el poli (D,L-láctico), presenta un estado amorfo (Gaucher, Marchessault, & Leroux, 2010). El PLGA 75/25 y PLGA 50/50 son resultado de la copolimerización del poli (ácido glicólico) con el polímero poli (D,L-láctico) en distintas proporciones. Esta copolimerización produce la pérdida de la cristalinidad del PGA y por lo tanto aumentan las velocidades de hidratación e hidrólisis, aumentando su susceptibilidad a ser degradado. Generalmente se favorece el uso de las formas amorfas en la aplicación de la administración de fármacos porque se obtiene una dispersión homogénea de los principios activos, consiguiendo una matriz monofásica. Por esta razón y para obtener características más favorables en el sistema, además, se utilizó el poli (D,L

láctico) como el polímero más hidrofóbico. La diferencia entre estos dos polímeros (poli láctico y poli glicólico) radica en la presencia de un grupo metilo en la cadena de PLA y su ausencia en la cadena de PGA (*Figura 7*). La simple presencia de este metilo produce un aumento de la hidrofobicidad del polímero, lo que impide la entrada de agua y disminuye su velocidad de hidrólisis y degradación. De esta forma los copolímeros que contengan una mayor proporción de PLA presentarán una hidrólisis más lenta. Esta diferencia de características va a tener un gran impacto en el perfil de liberación como se discute a más adelante.

Durante la atomización y secado se utilizó el diclorometano como disolvente. El diclorometano fue seleccionado en la preparación de las microesferas porque, aparte de ser un buen disolvente orgánico de los polímeros y del fármaco (lo que proporcionó la elevada incorporación del fármaco en las partículas), tiene un bajo punto de ebullición (39,8°C) (Blanco, Sastre, Teijon, Olmo, & Teijon, 2005), lo que facilitó su evaporación en la etapa de secado, fase crítica en la elaboración de sistemas matriciales por esta técnica. Cuanto mayor sea la velocidad de evaporación, mejor es la formación de las partículas, no solo por la rapidez sino porque, además, las temperaturas a las que se trabaja son menores disminuyendo así la probabilidad de alterar térmicamente cualquiera de los componentes. El diclorometano, como cualquier otro disolvente orgánico, puede presentar toxicidad por lo que es muy importante conseguir eliminarlo por completo (lo cual se ve muy favorecido por el bajo punto de ebullición que presenta). Cabe destacar que es un disolvente de segunda clase según la clasificación ICH y su administración está limitada (PDE: 6 mg/día concentración límite 600 ppm) y es considerado uno de los solventes halogenados que causa menos toxicidad (Jones, 1997). Por lo que si quedan algunos residuos de disolvente pueden ser aceptables siempre y cuando esté por debajo de los límites establecidos.

### **Estudios morfológicos**

Como se puede observar en las fotos realizadas con microscopio electrónico de barrido (*Figura 42*), las partículas obtenidas son muy esféricas con la superficie ligeramente rugosa. Dicha rugosidad puede deberse a la rápida evaporación del disolvente durante el proceso de atomización y secado (Luck et al., 1998) y no a la composición polimérica puesto que aparecen rugosos independientemente del polímero usado. Sin embargo la rápida eliminación del diclorometano permite obtener partículas más esféricas que si se usara otros disolventes con puntos de ebullición más elevados (Wang & Wang, 2003). La morfología se ve ligeramente

afectada por la presencia de fármaco ya que se observa una superficie más rugosa en las microesferas sin fármaco, con respecto a una superficie más lisa en las microesferas con fármaco. Estas rugosidades, como veremos más adelante, pueden determinar el perfil de liberación ya que amplían la superficie específica de la partícula y por lo tanto la degradación de la misma y liberación del TMX.

Se observa que todos los diámetros medios de cada síntesis son inferiores a 2  $\mu\text{m}$ , obteniendo un diámetro medio, de todas ellas, de 1,4  $\mu\text{m}$  ( $1,32 \pm 0,15 \mu\text{m}$  para las partículas con fármaco incorporado y  $1,55 \pm 0,25 \mu\text{m}$  para las partículas sin TMX). Se puede considerar que con esta técnica se obtienen partículas micrométricas muy pequeñas ya que se consideran micropartículas aquellos sistemas con diámetros comprendidos en el rango entre 1 – 250  $\mu\text{m}$  ( $< 1 \text{ mm}$ ) mientras que nanopartículas se encuentra entre 10 – 1000 nm ( $< 1\mu\text{m}$ ) (Mundargi et al., 2008). Un dato a destacar es el tamaño ligeramente superior de las microesferas sin fármaco respecto a las que sí lo han incorporado. Esto puede deberse a que el fármaco produce unas interacciones con los polímeros favoreciendo la síntesis de partículas más pequeñas y menos rugosas como consecuencia de la compactación del sistema. Este efecto no se cumple para las partículas S-LG50 sin TMX cuyo diámetro medio es inferior a 1  $\mu\text{m}$  y éstas son más pequeñas que cuando se incorpora el fármaco. Esto puede ser debido a que es el copolímero con las características más hidrofílicas y por lo tanto las interacciones con el fármaco hidrofóbico no son tan predominantes.

Como ya se ha comentado con anterioridad, la diferencia de tamaños que se observa entre las distintas síntesis (*Tabla 14*) puede deberse a las distintas interacciones entre el polímero, el disolvente y el fármaco. Estas diferencias en las partículas se aprecian claramente en la distribución de tamaños (*Anexo II*). Hay un elevado porcentaje de partículas nanométricas (11,2% – 77,7%) (*Tabla 14*). El 77,73% de las partículas de S-LG50 sin tamoxifeno tienen un tamaño comprendido entre 250 nm y 1  $\mu\text{m}$ , siendo la síntesis con el mayor porcentaje de partículas de tamaño nanométrico mientras que las partículas de S-LG75:L solo el 22,2% presenta un tamaño inferior a 1  $\mu\text{m}$ . A pesar de que el tamaño medio obtenido por esta técnica sea de micrómetros, hay un elevado porcentaje de partículas con un tamaño de nanómetros. Esto es importante constatarlo puesto que este parámetro tiene una gran relevancia a la hora de ver su aplicación posterior así como su comportamiento. El tamaño de la partícula va a determinar no solo la liberación del fármaco sino que también va a afectar a su velocidad de degradación, biodistribución del sistema por el organismo (Kamaly, Xiao,



Valencia, Radovic-Moreno, & Farokhzad, 2012) (Xia et al., 2012) e incluso a las interacciones celulares. Estos sistemas presentan, por tanto, unas buenas características para su aplicación en el tratamiento contra el cáncer. Se ha demostrado que las partículas más pequeñas tienen una mejor capacidad para alcanzar su lugar diana en diversas patologías como puede ser el cancer. Un ejemplo claro de la importancia del tamaño de estos sistemas tiene lugar con los fármacos para el tratamiento del cáncer. Por las características fisiológicas de un tumor estos fármacos tienen que alcanzar su diana terapéutica a través de vasos de un diámetro más pequeño (200 nm o menos) (Heslinga, Mastria, & Eniola-Adefeso, 2009) (Shim et al., 2013).

Todas las síntesis tienen una distribución de tamaños heterogénea (*Anexo II*) lo cual se ve corroborado con el valor del índice de polidispersidad (U) que es superior a 1 -1,1 en todos los casos (*Tabla 14*). Las que presentan una mayor dispersión de tamaños son S-LG75 - TMX y S-LG50 – TMX con un índice de polidispersidad de 2,23 y 2,22 respectivamente. Por otro lado S-LG50 sin TMX y S-LG50:LG75 - TMX son las que presentan una menor distribución de tamaños lo que se corrobora con los datos numéricos del índice de polidispersidad de 1,43 en ambos casos. Aparentemente, y en vista de estos resultados, la distribución de tamaños, no se ve afectada por los materiales poliméricos ni por la presencia de fármaco en la partícula, por lo que simplemente viene determinada por la técnica.

#### **Determinación del tamoxifeno incorporado en las micro/nanosferas**

Estas micropartículas incorporaron entre  $48,9 \pm 0,1$  y  $36,6 \pm 0,1$   $\mu\text{g}$  TMX / mg MS sienten un  $97,8 \pm 0,1$  y  $69,6 \pm 0,2\%$  en función de la composición copolimérica (*Tabla 23*). Estas eficiencias de incorporación fueron tan elevadas gracias a la buena solubilidad del polímero y TMX en el mismo disolvente seleccionado (DCM) quedando así el fármaco y polímero íntimamente unidos antes de formar la partícula (M. Blanco et al., 2003) lo que permite que se produzcan interacciones hidrofóbicas entre ellos. Otras eficiencias de incorporación indicadas en otros estudios utilizando la misma técnica de síntesis (spray dryer), pero con fármacos no solubles en el disolvente utilizado, obtuvieron eficiencias de incorporación inferiores (Murillo, Gamazo, Goni, Irache, & Blanco-Prieto, 2002) (Blanco-Prieto et al., 1999). Los sistemas que contienen el polímero poli Láctico (PLA) en la matriz (S-LG50:L y S-LG75:L) alcanzaron una eficiencia de incorporación inferior (77% y 69,6% respectivamente). Este hecho puede atribuirse a las características hidrofóbicas similares del PLA y TMX, por lo que parece que haya

una competición entre ambas sustancias por estar en la estructura del sistema produciendo una disminución de la cantidad del TMX en la partícula.

La mayor eficacia de incorporación se encontró en la síntesis cuya composición polimérica fue PLGA 75/25 (S-LG75-TMX), con 48,92 µg TMX / mg MS (97,84%). Mientras que la menor eficiencia de incorporación fue de un 69,9% para las partículas con el copolímero PLGA 75/25 y PLA (S-LG75:L-TMX), que han llegado a incorporar 36,6 µg TMX / mg MS. Esto concuerda con el ensayo de liberación tanto *in vitro* (Figura 51) como *in vivo* (Figura 69). *In vitro* se observa que el sistema S-LG75-TMX es el que más cantidad libera puesto que es el que más cantidad incorpora, y el sistema S-LG75:L-TMX es el que menos libera llegando a no detectarse *in vivo*.

### **Análisis termogravimétrico (TGA)**

Se estudió la estabilidad térmica de las microesferas con y sin TMX fue estudiada. Los intervalos de temperatura de los eventos térmicos son similares en todos los casos, produciéndose a partir de 110°C, lo que nos indica que las condiciones establecidas en el proceso de síntesis de las micropartículas (60°C) no alteran las propiedades y la estabilidad de los componentes (Tabla 3).

Como se observa en la Tabla 20 el TMX y el polímero PLGA 75/25 se degradan en un solo paso a una temperatura máxima de 258,3 y 345,8°C respectivamente. El PLA presenta dos etapas de degradación (299,2 y 345,8°C), así como el polímero PLGA 50/50 (310,8 y 357,5°C). Estos datos concuerdan con otros estudios realizados sobre los mismo polímeros (Penco, Sartore, Bignotti, D'Antone, & Di Landro, 2000) (D'Antone et al., 2001). La degradación térmica de las partículas presenta una sola etapa excepto en las partículas que contenían el polímero PLGA50/50 en mayor proporción (S-LG50 y S-LG50:L) que presentaron dos etapas. Mediante esta técnica queda demostrada la composición copolimérica al coincidir los eventos térmicos de las partículas con los de los polímeros.

La degradación térmica del tamoxifeno se produce entre 130°C y 375°C (Tabla 20) en una sola etapa con un máximo de pérdida de masa (68,91%) a 258,33°C. En todos los caso la presencia de TMX en los sistemas hizo más estable a las formulaciones, desplazando el pico de degradación a temperaturas más altas. Como se observa en la Figura 48 A el pico de

degradación del TMX desaparece cuando éste es incorporado dentro de las partículas, por lo que queda patente que el fármaco está protegido de la degradación en el interior de estos sistemas (Sun et al., 2014). Así mismo estos resultados demuestran una vez más que el fármaco interacciona íntimamente con los polímeros. Cabe destacar que el pico de degradación de las partículas se producen a una temperatura inferior comparando con los polímeros de origen, lo que cabe pensar que los polímeros pueden perder cierta estabilidad al ser sometidos a un proceso de atomización y secado. Esto es debido a que los polímeros con menor peso molecular de alguna manera quedan excluidas en la síntesis y formación de la partícula, quedando modificada el promedio en número del peso molecular del polímero que forma la partícula, como se ha visto en anteriores estudios con la técnica de DSC (M. Blanco et al., 2005). Hay que tener en cuenta, además, la posibilidad de una pequeña cantidad residual no tóxica de disolvente (diclorometano) en las partículas, teniendo un posible efecto plastificador que puede alterar la estabilidad térmica de éstas.

Si comparamos la estabilidad térmica entre las partículas que contenían fármaco (*Figura 48 A*) con las que no lo incorporan (*Figura 48 B*), los sistemas en cuya composición polimérica se encuentra el copolímero en proporción 75/25 (S-LG75 y S-LG75:L), la presencia de fármaco prácticamente no altera la temperatura a la cual se produce la mayor pérdida de masa (299,17°C - 305°C respetivamente). Para las que se formaron con el copolímero de proporción 50/50 se observa un cambio en el comportamiento térmico de las partículas en presencia del fármaco. Como ya se ha comentado, aquellas que incorporaban el tamoxifeno presentaron una temperatura mayor de degradación térmica (316,67°C) acompañada de una mayor pérdida de masa (60,86%) con respecto a las que no lo incorporaban (54,77%), siendo estas últimas más inestable térmicamente, por lo que parece que la presencia del tamoxifeno, con carácter hidrófobo, proporciona estabilidad a la partículas más hidrofílicas. Las partículas formadas por la mezcla de PLGA 50/50 y PLGA 75/25 con y sin tamoxifeno presentaron una etapa de degradación, con una temperatura de degradación ligeramente superior para las partículas con TMX, alrededor de 310°C.

En todas las partículas que contenían fármaco incorporado se observa una pequeña pérdida de masa a temperaturas inferiores que no aparece en sus homólogos sin tamoxifeno (*Figura 48 A*). Este hombro corresponde con el 1,39% - 12,23% de pérdida de masa entre 130°C y 246,67°C. A 258°C tiene lugar la degradación térmica el TMX comercial. Esta pérdida de masa inicial puede atribuirse, por tanto, a la presencia de fármaco en la superficie de la partícula siendo susceptible de la degradación térmica. Posteriormente, según aumenta la temperatura,

se le suma la degradación térmica del polímero, siendo la pérdida de masa mayor. Se ha establecido que en las partículas sintetizadas por la técnica de atomización y secado puede existir una distribución heterogénea de los componentes que generan distintos estados de agregación de los mismos (Ambike, Mahadik, & Paradkar, 2004) (Ohta & Buckton, 2005) pudiendo quedar tanto el polímero como el fármaco repartidos tanto en la superficie como en el interior del sistema, formando un sistema matricial y no reservorio.

En todos los casos la mayor pérdida de masa se produce en las partículas que contenían fármaco debido a que este se degrada junto con los polímeros.

### **Estudio de liberación del TMX a partir de los sistemas**

Las partículas se formularon con el copolímero PLGA, biomaterial sintético y biodegradable ampliamente conocido y estudiado. Por ello cabe esperar que los sistemas se biodegraden a través de un proceso de hidrólisis por el cual el fármaco se va a ir liberando. Debido a la diferente composición y por tanto a sus diferentes características hidrofílicas/hidrofóbicas se consiguen diferentes perfiles de liberación (*Figura 51*).

En el caso de las partículas de S-LG75-TMX, se alcanza una liberación máxima de 97,45% (del total del TMX que incorpora) a los 54 días (1299 h) que corresponde a 47,67 µg TMX / mg MS; para las constituidas por el copolímero S-LG50-TMX la máxima liberación, 94,64% lo que equivale a 45,03 µg TMX / mg MS, se consigue a los 14 días (336 h); con la mezcla de ambos copolímeros al 50% (S-LG50:LG75-TMX) se alcanza un máximo de liberación de 90,39% a 128 días (667 h), es decir, 43,94 µg TMX / mg MS (*Tabla 26*). En el caso de las partículas que contenían PLA, las S-LG50:L-TMX liberaron  $40,1 \pm 0,23$  µg TMX/mg MS (99,6%) en 11 días y las partículas S-LG75:L-TMX liberaron  $37,6 \pm 1,7$  µg TMX/mg MS (98,7%) en 58 días. Los sistemas que presentaron una mayor velocidad de liberación fueron las que contenían el polímero más hidrofílico en mayor proporción, S-LG50 y S-LG50:L, mientras que las que presentaron una liberación más ralentizada fueron las que contenían una mayor proporción de polímero hidrófobo (S-LG75:L) (*Tabla 29*). Estos resultados concuerdan con las eficiencias de incorporación, como ya se ha comentado. De esta manera, los sistemas que incorporaron una mayor cantidad de fármaco (S-LG75-TMX) (*Tabla 23*), son los que alcanzan una concentración mayor en la liberación aunque no es el sistema que más libera en relación al porcentaje encapsulado. En este aspecto, son los sistemas que contienen PLA los que

consiguen liberar un mayor porcentaje del fármaco encapsulado (99 - 98%) (*Tabla 26*), lo cual puede deberse a la baja interacción entre este polímero y el fármaco, previamente detectada al ser los sistemas que presentaron una eficiencia de incorporación menor.

Para estas composiciones vemos que claramente las características de los polímeros determinan el comportamiento de liberación. El ácido láctico es mucho más hidrófobo que el ácido glicólico por lo que su velocidad de degradación es más lenta y como consecuencia la liberación es más progresiva y tarda más en alcanzar la máxima liberación. Conforme a esto, se contempla que, efectivamente la composición con más cantidad de poli láctico (S-LG75:L) tarda más tiempo en alcanzar su máxima liberación (58 días) mientras que el S-LG50:L es el que menos tarda (11 días) (*Tabla 26*).

Por lo tanto, variando la composición polimérica de las microesferas pueden conseguirse cinéticas de liberación muy diferentes (*Figura 51*), lo que amplía la versatilidad de los sistemas preparados, generando un amplio intervalo de velocidades de liberación, en función de las necesidades.

Como se observa en la *Tabla 29*, los sistemas más hidrofóbicos (S-LG75 y S-LG75:L) mantienen durante más tiempo la velocidad de liberación haciendo las etapas más largas (200 h y 390 h) y a una velocidad mucho más ralentizada (2,6 y 0,87  $\mu\text{g TMX} / \text{h}$ ) comparado con los sistemas más hidrofílicos. Por el contrario, estos sistemas hidrofílicos, el S-LG50 seguido de S-LG50:LG75 y S-LG50:L, presentan unas velocidades más elevadas (73,36; 36,66 y 28,93  $\mu\text{g TMX} / \text{h}$  respectivamente) en una etapa mucho más corta (durante las primeras 9 horas). Esto está totalmente en concordancia con las liberaciones y el tiempo que tardan los sistemas en alcanzar el máximo de liberación siendo en ambos casos el siguiente orden: S-LG50 > S-LG50:LG75 > LG50:L > S-LG75 > S-LG75:L. El sistema que más tiempo tarda en liberar es que más lento libera. Estos resultados se corresponden con las cinéticas de liberación y la composición polimérica de los sistemas.

Como cabe esperar y puesto que, inicialmente podemos tener además de la degradación procesos de difusión del fármaco que se encuentra más superficial, la velocidad de liberación es mayor en las primeras etapas, para ir disminuyendo progresivamente a medida que se agota la cantidad de fármaco a liberar en el interior del sistema (Shah, Chaudhari, Dantuluri, Murthy, & Das, 2009)(Fenandez et al., 2012). Lo que se puede considerar

una liberación con una cinética de orden 1 en la que la velocidad depende de la dosis de fármaco en el sistema.

Los restos sólidos que quedaron después de la liberación, fueron sometidos a un estudio morfológico por FEG-SEM en el que se pudo apreciar el estado de degradación de las microesferas, después de 2 meses de liberación (*Anexo III*). Se observa que las partículas más hidrofílicas (S-LG50, S-LG50:LG75) se encuentran totalmente degradadas observándose solo unas masas poliméricas sin ninguna estructura esférica. Las partículas que contenían el polímero más hidrofóbico PLA (S-LG50:L y S-LG75:L) presentaron una apariencia menos degradada puesto que en los restos se puede apreciar estructuras esféricas.

Seguidamente, se realizó una extracción del tamoxifeno que haya podido quedar remanente dentro de los restos de las microesferas ya degradadas y que por lo tanto no ha sido liberado. Tras el correspondiente protocolo de extracción se cuantificó el tamoxifeno mediante el HPLC previa derivatización con UV y los resultados obtenidos se representan en la *Tabla 23*. La cantidad de tamoxifeno retenido en los restos de polímeros después de la liberación es muy bajo (inferior al 3% en todos los casos). Así las cantidades de tamoxifeno retenidas están en concordancia con la cantidad de fármaco incluido en la partícula y el liberado durante los 2 meses del experimento (*Tabla 26*). Las microesferas que más retienen el fármaco en su interior, después de la liberación, son las S-LG50:LG75 con un 2,13% lo que equivale a  $1,03 \mu\text{g TMX} / \text{mg MS}$  siendo los sistemas que liberaron un menor porcentaje del fármaco encapsulado ( $90,6 \pm 2,5\%$ ).

Estos datos nos dan la idea de que realmente el tamoxifeno se encuentra íntimamente unido con los polímeros de tal forma que solo se libera cuando éste es alterado, degradado o hinchado.

### **Aplicación de modelos matemáticos**

Se han aplicado diversos modelos matemáticos para justificar realmente los procesos por los cuales se lleva a cabo la liberación del fármaco en estos sistemas. Como se ha analizado en la sección de resultados hay varios modelos a los cuales se ajustan las liberaciones, lo que señala que hay varios mecanismos por los cuales se produce y controla la liberación.

Al aplicar el modelo de Higuchi, basado en la teoría de difusión del fármaco (*Ecuación 3*), se obtuvieron unos valores de constante de velocidad de difusión ( $K$ ) superiores a  $1 \text{ h}^{1/2}$ , en todas las microesferas (*Tabla 32*). Los valores de los correspondientes coeficientes de correlación pueden considerarse significativos (entre 0,94 y 0,98) hasta un 97% y 98% de fármaco liberado. Conforme a esto podemos decir que todas las liberaciones son directamente proporcionales a la raíz cuadrada del tiempo (tiempo  $^{1/2}$ ) y que existe un proceso de difusión del fármaco a través de la matriz polimérica, aunque esto no implica necesariamente que sea el único proceso determinante de la liberación.

El modelo de Korsmeyer-Peppas se basa en el mecanismo de liberación del fármaco en función de la geometría del sistema de liberación (*Ecuación 4*), implicando el hinchamiento y/o difusión como procesos determinantes. Por linealización logarítmica, se han obtenido coeficientes de correlación entre 0,96 y 0,99 con este modelo, por lo que se ha podido determinar el exponente de liberación ( $n$ ) de la pendiente de la recta. El valor de ( $n$ ) indica el mecanismo de liberación (hinchamiento, difusión o ambas). El valor obtenido es inferior a 0,43 para todos los sistemas estudiados (*Tabla 23*), lo que señala que hay una dispersión de tamaños y no se puede determinar con exactitud un mecanismo de liberación a través de este modelo, excepto para el caso de PLGA 75/25, cuyo valor es de 0,44 (muy próximo a 0,43) lo que indica que la liberación cumple la segunda Ley de Fick de difusión siendo la única liberación fickiana. Este modelo se ha aplicado a toda la liberación hasta el máximo liberado (100%) en la mayoría de los casos.

El tercer modelo aplicado, Hopfenberg, basado en la degradación polimérica, ha permitido determinar la velocidad de liberación directamente dependiente del área de la superficie y del tiempo, como demuestra su ecuación (*Ecuación 5*). Se obtuvieron buenas correlaciones con este modelo por lo que se puede afirmar que hay procesos de degradación en los sistemas. Realmente lo que Hopfenberg determina es la velocidad de liberación del fármaco, que al estar íntimamente relacionado con la degradación polimérica, se puede deducir si este mecanismo interviene en la liberación. En base a los resultados del estudio morfológico, en el que se demuestran que los sistemas son esféricos, se toma el valor  $n$  en la ecuación como  $n=3$ . La erosión de las micropartículas depende de las características del polímero, del tamaño del sistema y el proceso de síntesis de las partículas (Dunne et al., 2000) por lo que la cinética de liberación generada por la erosión va a depender de la composición y características de los polímeros que las constituyen. Cuando se estudió esta ecuación en las

liberaciones obtenidas se descubrió que se pueden diferenciar claramente dos fases diferentes a las cuales se ajusta.

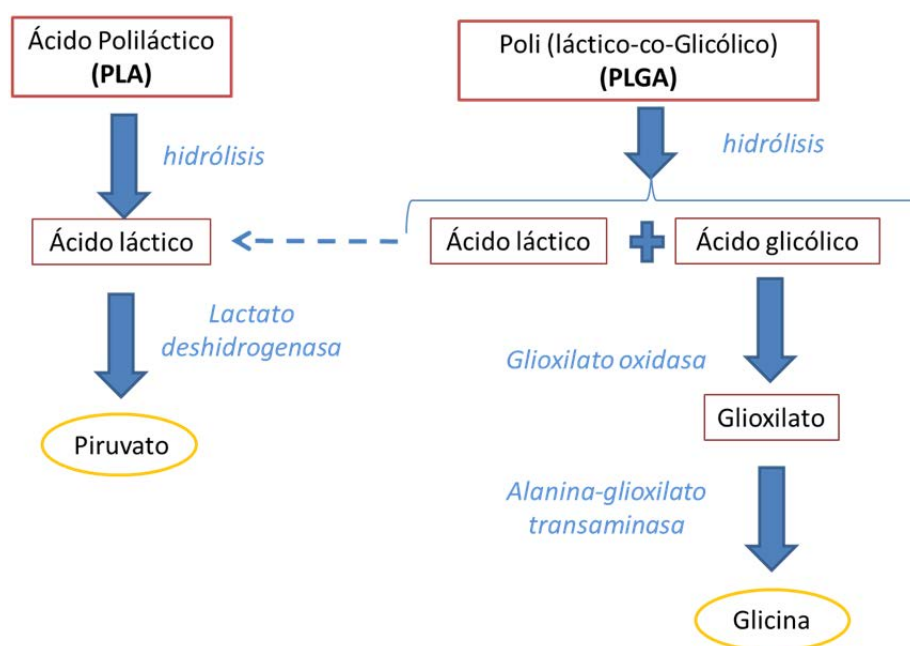
Una primera etapa abarcaría desde el inicio de la liberación hasta un 45%-54% de tamoxifeno liberado y la segunda etapa hasta una liberación del 90%. Hay que tener en cuenta que, en este modelo, el valor de la constante de liberación del fármaco ( $K$ ) es directamente proporcional al grado de degradación polimérica. En todos los casos la primera etapa tiene una  $K$  superior a la segunda etapa, lo que nos indica que, en esta primera fase, la velocidad de liberación es mayor, y que a partir del 45%-54% la liberación se ralentiza (*Tabla 32*). Si nos fijamos en la composición polimérica vemos que aquellas microesferas con mayor proporción de PLA en la matriz tienen una  $K$  menor, lo que está de acuerdo con su carácter hidrófobo y su menor de degradación comparado con PLGA. Esta diferencia se observa perfectamente entre PLGA 75/25 y PLGA 50/50, confrontando ambas etapas por separado. Los valores de  $K$  de la mezcla copolimérica PLGA 75/25 + PLGA 50/50 ( $0,08 \text{ h}^{-1}$ ) son mayores que las de la composición PLGA 75/25 ( $0,02 \text{ h}^{-1}$ ) como corresponde a una liberación más rápida del fármaco, consecuencia de una mayor tasa de degradación debido al componente hidrofílico (PLGA 50/50). Consecuentemente el sistema que presentó una menor velocidad de degradación fue el S-LG75:L debido a que es el sistemas más hidrofóbico de todos. Una vez más, está relacionado con los ensayos de liberación y por tanto se confirma que la velocidad de liberación está íntimamente determinada por la composición copolímerica y sus características hidrofílicas / hidrofóbicas (a mayor hidrofília, mayor es el proceso de hidrólisis y por tanto mayor es la velocidad de liberación).

En base a los resultados obtenidos a través de las tres ecuaciones matemáticas, se puede concluir que la liberación del fármaco incluido en las microesferas de poliésteres es controlada por tanto mediante mecanismos de difusión y erosión, como ya se ha demostrado en otros estudios (Lemaire, Belair, & Hildgen, 2003) (Blanco et al., 2006) (Wong et al., 2011). También se ve involucrado el mecanismo de hinchamiento del polímero en una primera fase, en la que la liberación del fármaco viene determinada por la difusión del mismo a través de la matriz polimérica y posteriormente sobrevendría una segunda fase en la que los enlaces poliméricos se rompen dando lugar a la erosión y por consiguiente liberación del fármaco (Fenandez et al., 2012).



### Estudios en cultivos celulares

En general la citotoxicidad de las partículas (MS) fue muy baja (*Figura 54*). El intervalo de supervivencia celular en presencia de varias concentraciones de las partículas sin TMX (75,5 – 474  $\mu\text{g NP/ml}$ ) fue de  $139 \pm 6\%$  y  $72 \pm 5\%$  en las células MCF7. A bajas concentraciones (75,9 – 94,9  $\mu\text{g NP/ml}$ ), las partículas sin TMX parecieron inducir una proliferación a corto tiempo. Este efecto fue más patente en las formulaciones S-LG50 y S-LG50:LG75. Esto es debido a la elevada bicompatibilidad de los polímeros PLGA y los mecanismos por los cuales es biodegradado y eliminado. Se sabe que el PLGA, durante el proceso de hidrólisis, produce los metabolitos ácido láctico y ácido glicólico, ambos compuesto endógenos fácilmente metabolizados por el organismo (Kumari, Yadav, & Yadav, 2010). El ácido láctico, por la acción del lactato deshidrogenasa se convierte en piruvato, compuesto del metabolismo natural celular. Mientras que el ácido glicólico por la acción de la glioxilato oxidasa y después por una alanina-glioxilato transaminasa se transforma en glicina, un amino ácido muy común en el organismo (Fenandez et al., 2012). Tanto el piruvato como la glicina se consideran sustratos celulares lo que puede inducir ese crecimiento inicial celular (*Figura 76*).



**Figura 76:** Metabolización de los polímeros poli láctico (PLA) y poli (Láctico-co-Glicólico) (PLGA)

Los sistemas que incorporaron TMX presentaron sin embargo una buena actividad citotóxica debido a la liberación del fármaco (*Figura 54*). Puesto que las partículas controlan la liberación del fármaco se observa que la viabilidad celular disminuye con el tiempo. Además

los resultados celulares están en total concordancia con la velocidad de liberación ya que el sistema más hidrofílico (S-LG50) que libera mucho más rápido (según los ensayos de liberación) (*Figura 51 y Tabla 29*) es el que produce una mayor muerte celular y disminuye la viabilidad celular más rápidamente a los tres tiempos analizadas, llegando a producir la muerte total del cultivo al 6º día a la concentración de 30  $\mu\text{M}$ . Este sistema (S-LG50) produce el mismo efecto en las células que el TMX en solución al 6º día. Las partículas más hidrofóbicas, con una liberación mucho más lenta, disminuye la viabilidad celular hasta el 53,7% a 10  $\mu\text{M}$  sin llegar a producir una muerte celular total ni siquiera a la máxima concentración de 50  $\mu\text{M}$  (34,6%), lo que es debido a la liberación lenta no alcanzando la concentración necesaria para producir la muerte celular en dicho tiempo.

Estos resultados demuestran que la acción del fármaco es dosis dependiente ya que al aumentar la dosis administrada al cultivo aumenta la acción del fármaco tanto en disolución como incorporado en las partículas. También se ratifica, una vez más, que los sistemas son capaces de contener el fármaco en su interior sin que ejerza acción y pueden controlar la liberación del mismo aumentando progresivamente su acción.

### **Estudios *In Vivo***

En este punto, se ha realizado una caracterización *in vitro* y los resultados obtenidos son adecuados para una evaluación *in vivo*. Los sistemas, a pesar de tener un tamaño de micras, se encuentran muy cercanos al intervalo de nanómetros y por lo tanto susceptibles de ser inyectados. Son capaces de controlar la liberación del fármaco variando la composición copolimérica y son biocompatibles y eficaces en un cultivo celular. Con estos resultados prometedores el siguiente paso fue comprobar esa biocompatibilidad y su comportamiento en un organismo *in vivo*. Los estudios *in vivo* han adquirido especial relevancia puesto que con ellos se es capaz de evaluar determinados aspectos que no se pueden evaluar de cualquier otra forma (Guerrero Monjo, 2011). Es imprescindible una evaluación biológica de los sistemas, conociendo su comportamiento en un ambiente biológico y como las diversas sustancias fisiológicas afectan a la liberación del fármaco. Generalmente la presencia de elementos extraños y externos al organismo desencadena una reacción tisular y celular como mecanismo de defensa. El análisis *in vivo* va a permitir no solo conocer el comportamiento de los sistemas sino también predecir la respuesta del organismo ante ellos.

Las ratas fueron seleccionadas como animal de experimentación en estos ensayos. En estudios llevados a cabo por Kisanga y colaboradores (Kisanga, Gierde, Schjott, Mellgren, & Lien, 2003) compararon ratas nude con ratones como animales de experimentación para el estudio del TMX. Estos estudios demostraron que las concentraciones en suero y tejidos encontrados en cada una de las dos especies fueron distintas. Las concentraciones de TMX y uno de sus metabolitos (4OH-TMX), así como el perfil de distribución, obtenidos en las ratas fueron más similares a la situación humana. En este mismo sentido, otros estudios llevados a cabo por Robinson y colaboradores, (Robinson, Langanfahey, & Jordan, 1989) (Degregorio, Coronado, & Osborne, 1989) demostraron que las concentraciones séricas de 4OH-TMX eran más altas que las del TMX en el caso de los ratones, cosa que no ocurre en los humanos ni en las ratas. Por este hecho se ha decidido realizar este estudio en ratas puesto que el fármaco presenta un comportamiento más parecido al hombre. El depósito de las partículas se realizó subcutáneamente a lo largo del lomo del animal, evitando su acumulación en un único punto para favorecer la asimilación. Los sistemas utilizados solo fueron aquellos que presentaron un perfil de liberación más diferente entre ellos (S-LG50; S-LG50:LG75 y el S-LG75:L).

#### Estudio de las concentraciones plasmáticas del TMX

Como se ha demostrado a través de los estudios *in vitro*, la liberación del fármaco desde estos sistemas es producida mayoritariamente por procesos de difusión y erosión de la matriz polimérica. Debido a lo cual, si no hay una degradación no se produce la liberación y por lo tanto no se alcanzan concentraciones plasmáticas detectables. Diferentes concentraciones plasmáticas de TMX y 4OH-TMX se han mostrado en función del sistema, debido a sus distintas características poliméricas (*Figura 69 y Tabla 35*). Este efecto concuerda con los estudios de liberación *in vitro*, teniendo una liberación más rápida el sistema más hidrofílico (S-LG50-TMX) y más lenta el S-LG75:L (*Figura 51*). El metabolito 4OH-TMX fue también evaluado, aunque no es el metabolito mayoritario, es hasta 100 veces más potente que el propio TMX debido a una mayor afinidad por los receptores de estrógeno (Blanco et al., 2010) (Shin, Choi, & Li, 2006) (Jordan, Collons, Rowsby, & Prestwich, 1977). En este sentido el sistema S-LG50-TMX alcanza concentraciones plasmáticas de TMX y 4OH-TMX más rápidamente en 8 h y 11 h respectivamente, mientras que el sistema más hidrofóbico (S-LG50:LG75) tarda 23,5 h y 215 h respectivamente aunque sí que es cierto que alcanza mayores concentraciones plasmáticas, 1,3 veces más. El sistema más hidrofóbico de los tres ensayados (S-LG75:L) presentó la

liberación más lenta *in vitro* y por lo tanto, también *in vivo*. En este caso, tanto el TMX como el 4OH-TMX, alcanzaron concentraciones plasmáticas tan bajas que fueron indetectables por la técnica del HPLC, teniendo en cuenta que el límite de detección de la técnica para el TMX y 4OH-TMX es de 2 ng/ml (MacCallum, Cummings, Dixon, & Miller, 1996).

Cuando el TMX se administró en disolución subcutáneamente, las concentraciones plasmáticas de TMX y 4OH-TMX fueron las más altas conseguidas (40 ng/ml en 8h y 24,69 ng/ml a 48h, respectivamente). Sin embargo desde el cuarto día, después de la administración única, su presencia en plasma no fue detectable. Aunque con los sistemas se alcanzaron concentraciones inferiores fueron más mantenidas en el tiempo hasta 23 y 215 horas. Este resultado demuestra que la administración del fármaco con las microesferas prolonga la permanencia del TMX en plasma durante más de 44 días gracias a la liberación controlada. Estos sistemas mantienen concentraciones más estables comparadas con una administración repetida de TMX en disolución.

El metabolito más activo (4OH-TMX) alcanza su concentración máxima cuando el TMX ya empieza disminuir su concentración, de esta forma, la actividad antiestrogénica permanece después del que el TMX se empiece a eliminar. Como cabría esperar las concentraciones plasmáticas del 4OH-TMX eran inferiores a las del TMX puesto que el TMX se biotransforma en otros metabolitos a parte del 4OH-TMX como son el N-Dimetil-tamoxifeno o el endoxifeno (Kisanga, Moi, Gjerde, Mellgren, & Lien, 2005) (*Figura 18*). Menores concentraciones de 4OH-TMX pueden ser tan activas como el TMX, debido a que es mucho más potente, la actividad antiestrogénica permanece después de que el TMX sea metabolizado.

#### Estudios farmacocinéticos

En el estudio no compartimental realizado se han encontrado diferencias significativas entre la administración subcutánea de TMX mediante las MS y la administración del TMX en disolución. Los resultados farmacocinéticos demostraron que la administración mediante los sistemas poliméricos aumenta significativamente la permanencia del fármaco en plasma y su biodisponibilidad al verse aumentados significativamente el  $AUMC_0^\infty$ , el MRT (tiempo medio de residencia), la biodisponibilidad absoluta (AB) y la biodisponibilidad relativa (RB) (*Tabla 35*). Esto demuestra que en *in vivo* también hay un control de la liberación por parte de los sistemas poliméricos y que se prolonga la liberación y la permanencia tanto del fármaco (Sun

et al., 2014) como del metabolito analizado. Sin embargo, cuando el TMX se administró en disolución subcutáneamente (a la misma dosis que las partículas), se alcanzaron concentraciones plasmáticas más altas pero su permanencia en el organismo fue inferior. Incluso, como se ha visto en anteriores estudios, cuando el TMX se administró por vía intravenosa en una dosis muy inferior (2,8 mg/kg) se alcanzaron concentraciones plasmáticas aún más elevadas, debido a que es una vía de administración con un 100% de biodisponibilidad, pero lógicamente con un tiempo de residencia menor (M. Blanco et al., 2010). Cabe destacar que la relación de metabolitos no varía ni se ve afectado por el tipo de administración tanto si es en partículas o en disolución, como si es intravenosa o subcutánea, esto es indicativo que el metabolismo del fármaco no se ve alterado.

Estos resultados ratifican la mejora terapéutica de las partículas puesto que se ha demostrado que la terapia contra el cáncer es más eficaz si se administran bajas dosis durante periodos de tiempo más prolongados, en vez de dosis mayores en periodos de tiempo más cortos (Wermuth, 2002). La dosis terapéutica de TMX actualmente usada para el tratamiento y prevención del cáncer es de 20 mg por día y oralmente, la cual presenta ciertas desventajas por esta vía de administración. Se corre el riesgo de no alcanzar concentraciones plasmáticas constantes, ya que la administración continuada de TMX vía oral no alcanza el equilibrio hasta la cuarta semana, sin tener en cuenta la falta de cumplimiento terapéutico, por el olvido de alguna toma, por parte del paciente. Todas estas situaciones son eludidas por los sistemas de liberación controlada ya que alcanzan concentraciones plasmáticas estables desde el primer día después de la administración y mejora el cumplimiento posológico (Sun et al., 2014).

#### Estudio del índice organosomático

El cálculo de del índice organosomático (IOS) puede dar una idea de si un órgano está dañado o no por la biodistribución o bioacumulación de un fármaco en él. Se ha observado que el TMX se biodistribuye y se suele acumular en determinados órganos pudiendo causar un efecto no deseado en ellos. En los resultados se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados, especialmente en el riñón (*Figura 74*). Los índices organosomático de los riñones de las ratas control fueron significativamente diferentes a las tratadas con MS-TMX y TMX en disolución pero no de aquellas tratadas con MS sin TMX (MS blanco). Lo que demuestra que las partículas, por si solas, no producen ningún daño o cambio en los riñones ni en ningún otro órgano y el daño producido es debido al TMX. Los IOS de los

bazos de las ratas tratadas con TMX en disolución fueron significativamente elevados comparados con cualquier otro tratamiento así como con el grupo control. Esto es un signo o evidencia de la capacidad dañina que puede tener el fármaco sobre algunos órganos no diana y que es minimizada cuando se engloba en un sistema polimérico de liberación controlada. Los sistemas de liberación controlada son capaces de evitar este daño orgánico disminuyendo así uno de los posibles efectos adversos del fármaco y mejorando por tanto la formulación. Si bien es cierto en uno de los órganos donde puede producir un mayor efecto es en el útero al presentar riesgo de desarrollar un cáncer endometrial (Riggins, Schrecengost, Guerrero, & Bouton, 2007), sin embargo en los estudios realizados no se encontró diferencias significativas en este órgano.

#### Estudio de la biodistribución

Cuando una sustancia es introducida en el organismo por cualquier vía y alcanza el plasma, dicha sustancia es biodistribuida por el torrente sanguíneo a todas las partes del organismo. Esto puede ser beneficioso cuando se quiere un efecto a nivel sistémico pero puede ser una acción adversa cuando solo se quiere una acción localizada. La idea, para mejorar un efecto en la diana terapéutica, es administrar las partículas en la proximidad del tumor para que libere el fármaco directamente en el lugar de acción, lo cual es factible debido a su pequeño tamaño. Sin embargo sí que es cierto que parte del fármaco puede llegar al torrente sanguíneo y ser biodistribuido.

Para este estudio se seleccionaron órganos no diana del TMX, los cuales son susceptible de acumular el fármaco. Los órganos escogidos (hígado, bazo, riñón y útero) presentan una interacción específica con el TMX. El hígado es el principal órgano de metabolización. En el caso del riñón es el órgano primario de metabolismo y excreción de los estrógenos (Muftuler et al., 2008) y en el útero el TMX aumenta el riesgo de desarrollar un adenocarcinoma endometrial (Heres-Pulido et al., 2004). Además, el hígado y útero presentan receptores de estrógenos (ERs) lo que les hace ser órganos susceptibles de ser atacados por el fármaco cuando lo que se busca es un efecto de acción focalizado exclusivamente en la mama donde también hay receptores de estrógeno.

La concentración del TMX y 4OH-TMX en diferentes órganos no diana varió cuando se administró con los sistemas poliméricos comparado con la administración del TMX en

disolución (Figura 73). En el caso del fármaco administrado en disolución subcutáneamente mayoritariamente se acumuló en el hígado, después en los riñones seguido de bazo y útero. Esta distribución cambió cuando se administró con las MS. El sistema más hidrofóbico (S-LG75:L) mostró una biodistribución similar al del TMX en disolución, mientras que los otros dos sistemas más hidrofílicos (S-LG50 y S-LG50:LG75) generaron una mayor acumulación del fármaco en los riñones seguido del hígado, bazo y útero. Es altamente destacable que con la administración del fármaco mediante MS la concentración de TMX y 4OH-TMX acumulada en estos órganos disminuye significativamente. Esto ya se puede considerar una ventaja terapéutica ya que al disminuir la acumulación en los órganos no diana se disminuye la probabilidad de causar cualquier efecto adverso, mejorando así la seguridad de la terapia. La gran acumulación de TMX en el hígado cuando se administró en disolución es debida a la atracción hidrofóbica, y a la presencia de los receptores de estrógenos y a la recirculación enterohepática de los metabolitos (Strickland et al., 1990). Sin embargo cuando se administró con los sistemas poliméricos mayoritariamente se acumuló en el riñón. Esto sugiere que el fármaco cuando es liberado desde los sistemas va directamente a los riñones, ya que es el órgano mayoritario de la excreción renal de los estrógenos (Muftuler et al., 2008). Para completar estos resultados se realizó el estudio histológico de estos mismos órganos y de la zona de administración subcutánea para demostrar cualquier daño estructural o funcional haya podido causar esta pequeña acumulación del fármaco.

### Estudios histológicos

En todas las histologías hepáticas, las células de las ratas tratadas con MS-TMX presentaron un núcleo menos picnótico con pequeños cambios en la integridad celular, lo que indica un daño celular (Figura 75 A1). Esto puede deberse al efecto hepatotóxico del TMX y la secreción hepatobiliar de los estrógenos que se ha observado en algunos casos a pesar de que no es el órgano principal de excreción y aclaramiento para este tipo de moléculas (Muftuler et al., 2008). Otros parámetros como son la aspartato amino transferasa (AST/GOT) y la alanina aminotransferasa (ALT/GOT) fueron estudiados en el plasma para evaluar este posible daño hepático cuando se administraron las MS con TMX puesto que son dos parámetros bioquímicos que, entre otros, determina el estado funcional hepático. Los resultados (Anexo IV) no se vieron significativamente aumentados en ninguna de los diferentes grupos de ratas por lo que el daño hepático como tal no se puede afirmar. Este posible daño hepático

producido por el TMX debería observarse también en el hígado de las ratas tratadas con TMX en disolución, sin embargo no se apreciaron estos cambios histológicos, a pesar de que, según los resultados de biodistribución, es el órgano que más cantidad de TMX y 4OH-TMX tenía acumulados. Esto puede deberse al menor tiempo (solo tres días) en el que ha estado en contacto con el fármaco ya que el daño que un fármaco o sustancia puede producir en un órgano o sistema viene determinado no solo por su toxicidad, sino también por la dosis y por el tiempo de exposición.

Un daño claro se observó en el riñón en las ratas tratadas con TMX en disolución, lo cual puede deberse a que el riñón es el órgano mayoritario de metabolismo y excreción de estrógenos (Muftuler et al., 2008). Se observó una desorganización a nivel del cortex afectando tanto a los túbulos distales como proximales y al glomérulo. Este daño fue menos evidente en los riñones de las ratas tratadas con las MS-TMX (*Figura 75 B*). Cuando el TMX es administrado en disolución es eliminado mayoritariamente por los riñones, ya que partículas de unas 5 o 6 nm o pequeñas moléculas son más rápidamente eliminadas por este órgano (Phillips et al., 2010), mientras que partículas más grandes son eliminadas por el retículo endoplasmático por opsonización en el hígado, pulmón o bazo. Por esto, cuando el TMX es administrado por MS, al ser partículas más grandes, pueden ser eliminadas por el hígado viéndose este órgano más afectado que el riñón. Es destacable que en todos los casos no se encontraron células mononucleadas (signo de inflamación), en ninguna de las histologías.

Como se ha comentado anteriormente, los parámetros hepáticos no se encuentran significativamente alterados permaneciendo dentro de valores normales (AST 46 – 81 U/L y ALT 18 - 30 U/L) (Zuñiga, Tur Marí, Milocco, & Piñeiro , 2001). En cuanto a los parámetros renales (creatinina y lactato deshidrogenasa) también permanecieron dentro del intervalo normal durante todo el experimental (LDH: 207 – 414 U/L y CRT: 0,6 – 1,1 mg/dl). Sin embargo se aprecia un incremento de los valores en las ratas tratadas con TMX en disolución. Este resultado está en concordancia con los estudios histológicos donde los riñones de las ratas tratadas con TMX en disolución mostraron daños estructurales.

Es importante y relevante también analizar la zona de inyección donde se administraron las partículas, ya que el estudio histológico en esta zona puede proporcionar información sobre su biocompatibilidad. Cuando el TMX se administró en solución se observó el desarrollo de un granuloma. Este granuloma es producido por la reacción del organismo al contacto directo con el fármaco. Cuando el organismo se encuentra con una sustancia extraña



puede presentar una inmunidad innata que es inespecífica y una inmunidad adaptativa o específica. En el caso del granuloma es una lesión producida por una inmunidad innata prolongada. Inicialmente se desarrolla una lesión con la formación de la matriz provisional para desarrollar una inflamación aguda que se cronifica con el tiempo. Cuando esta inflamación crónica permanece en el tiempo se acumulan los fibroblastos y células endoteliales vasculares formando nuevos vasos (neovascularización). Como se observa en la *Figura 70*, en el granuloma formado se aprecian mastocitos, liberando citoquinas procedentes de la inflamación, y tejido conectivo, con la presencia de vasos nuevos. Claramente el TMX en contacto directo con el organismo desencadena una reacción de rechazo. Sin embargo, cuando el fármaco se administró con los sistemas no se observó ni la formación del granuloma ni de la cápsula fibrosa, que en otros estudios similares con partículas de PLGA se había detectado (Sastre et al., 2007). La cápsula fibrosa aparece debido al agravamiento y progresión del granuloma, considerándose una reacción por parte del organismo ante un biomaterial, produciendo un aislamiento total del resto del organismo, al ser reconocido como algo extraño (Mitchell, 2013). Gracias a la elevada biocompatibilidad del PLGA y a la forma de administración, a lo largo del lomo del animal, no se desarrolló esta respuesta. Como muestran anteriores estudios de degradación, el PLGA 50/50 es completamente degradado entre el primer y segundo mes después de ser implantado mientras que el PLGA 75/25 y el PLA tardan entre dos y tres meses (Sastre et al., 2007). Por esto, los estudios histológicos de la zona de inyección de las partículas S-LG50 y S-LG50:LG75 revelaron un elevado grado de degradación al observarse solo pequeños acúmulos de restos de partículas dispersos por el tejido (*Figura 71*) sin la presencia de ningún elemento que indique una respuesta de rechazo (linfocitos, células gigantes de cuerpo extraño o fibroblastos). En el caso de S-LG75:L sin fármaco se observó una acumulación de partículas después de la capa muscular (*Figura 72*), lo que demostraba el bajo grado de degradación debido a la presencia de PLA en estas partículas. Estas mayores acumulaciones de partículas estaban cercadas de tejido conectivo de nueva formación sin llegar a crear una cápsula fibrosa con ausencia de fibroblastos y angiogénesis, así mismo tampoco se observaron mastocitos o células mononucleares, lo que indica que no hay una reacción de inflamación crónica. Sin embargo sí que se vio la presencia de células gigantes de cuerpo extraño con capacidad macrofágica, señal de que los sistemas están siendo aceptados y asimilados por el organismo siendo una reacción normal ante un biomaterial. Se ha descrito que los macrófagos y las células gigantes de cuerpo extraño pueden liberar mediadores de la degradación (Anderson et al., 2008) fomentando así la asimilación de los sistemas. A pesar de ser micropartículas no superan el tamaño de 2  $\mu\text{m}$ , por lo que pueden ser perfectamente

fagocitadas, ya que este proceso se lleva a cabo con partículas hasta un tamaño de 5  $\mu\text{m}$  (Suri, Ruan, Winter, & Schmid, 2013). El hecho de que el sistema S-LG75:L tarde más en ser degradado totalmente hace que, después del experimental, se encuentren todavía un gran acumulo de partículas en el lugar de inyección. Sin embargo las partículas formadas por la misma composición copolimérica pero con TMX (S-LG75:L – TMX) no se encontraron en tanta concentración. Esto significa que su degradación ha sido más rápida, lo que puede deberse a que el fármaco cuando se libera deja poros y canales en la matriz polimérica favoreciendo el proceso de degradación del sistema. Este efecto no ocurre en las partículas sin fármaco puesto que están formadas totalmente por polímero haciendo a la partícula más sólida y más difícil de degradar. En todos los casos no se observaron células mononucleadas (señal de una inflamación crónica) ni de rechazo, confirmando la biocompatibilidad de los sistemas.

## **2.- NANOPARTÍCULAS SINTETIZADAS POR EMULSIÓN**

### **Síntesis de nanopartículas:optimización de la metodología**

Una vez sintetizadas, caracterizadas y evaluadas tanto in vivo como in vitro los sistemas basados en poliésteres alifáticos sintetizados por la técnica de Spray dryer se procedió a buscar una técnica que mejorara las características de estos transportadores.

Se ha buscado sintetizar sistemas basados en el mismo tipo de poliésteres, puesto que presentaron buenas características de liberación y biocompatibilidad, pero de un tamaño más pequeño, debido a que las nanopartículas presentan una serie de ventajas frente a las micropartículas ( Wang, Chuang, & Ho, 2012):

- Disminuye el aclaramiento renal
- Aumentan su tiempo de circulación sistémica (Sun et al., 2014)
- Presentan una mayor facilidad para extravasar vasos y llegar a la diana
- Tienen una mayor superficie específica
- Presentan una buena capacidad para ser funcionalizados.
- Mayor incorporación celular (Orive, Gascon, Hernandez, Dominguez-Gil, & Pedraz, 2004) y en concreto, en células tumorales (He, Hu, Yin, Tang, & Yin, 2010)

La técnica de emulsión es una técnica muy utilizada para realizar síntesis de partículas poliméricas, siendo un método con una amplia versatilidad, sencilla y fácil purificación posterior. Inicialmente se procedió a optimizar la técnica buscando las condiciones más adecuadas para obtener los mejores sistemas. Uno de los puntos relevantes en esta técnica es la estabilización de la emulsión. Una emulsión es un sistema disperso heterogéneo termodinámicamente inestable. Presentan tres componentes: la fase acuosa, fase oleosa u orgánica y el sistema tensioactivo. Este sistema tensioactivo, que puede estar formado por uno o por varios emulgentes, es un componente clave para la estabilización ya que afecta a la formación de las gotículas de la fase interna (en cuanto a cantidad y tamaño). Por ello, se estudió cómo afecta las distintas concentraciones (0,5; 1; 2%) de tensioactivo (PVA) en la emulsión simple. Del tensioactivo va a depender la formación de las gotículas de la fase interna, la cual va a influir directamente sobre el tamaño final (Manchanda, Fernandez-Fernandez, Nagesetti, & McGoron, 2010) (Niwa, Takeuchi, Hino, Kunoou, & Kawashima, 1993) y la dispersión de tamaños de las partículas, por lo que se considera un paso crítico en la síntesis. Con las tres concentraciones de PVA se consiguió emulsiones estables y con la consecuente formación de las partículas. Las fotos del microscopio electrónico de barrido demuestran que las partículas obtenidas son esféricas y de superficie lisa independientemente del porcentaje de tensioactivo (*Figura 43*), sin embargo a medida que se aumentó la concentración de PVA en la emulsión, el tamaño de partícula aumentó, aunque en todo momento el tamaño estuvo dentro de la escala nanométrica (*Tabla 15*). Con un 2% de PVA se obtuvieron las partículas significativamente más grandes ( $372 \pm 91$  nm) mientras que con un 0,5% de PVA se consiguió un tamaño más pequeño de  $72 \pm 14$  nm. Teniendo en cuenta estos resultados, se seleccionó la concentración de 0,5% de PVA puesto que además de obtener el menor tamaño de partícula, es la menor cantidad de tensioactivo y por lo tanto la purificación posterior a la síntesis será más sencilla. Además, esta misma concentración de tensioactivo ha sido usada por otros autores en síntesis de partículas similares (Mundargi et al., 2008) (Manoochehri et al., 2013). Cabe destacar el alto rendimiento de la técnica con un 2% de PVA, llegando a ser del 242,3%. Puede ser debido, porque al tener una mayor cantidad de PVA, no se ha eliminado correctamente durante la etapa de purificación. Otro parámetro que se estudió en esta técnica, es la cantidad de TMX en la síntesis, buscando obtener mejores eficiencias de incorporación con la mayor cantidad de fármaco encapsulado. Las partículas obtenidas mediante la síntesis con un 0,5% de PVA con TMX no mostraron un tamaño significativamente distinto a sus homologas sin TMX (*Tabla 16*). Se consiguió un tamaño medio entre 72 - 147 nm y el rendimiento fue muy elevado en todos los casos (por encima del 76%).

El pequeño tamaño de las partículas también depende del proceso / técnica mediante la cual se ha dispersado la fase interna en la externa. Para ello se ha recurrido a un equipo de ultrasonidos, proceso que rompe de forma más afectiva la fase interna en gotículas más pequeñas quedando dispersas homogéneamente por la fase externa. Además mediante este equipo se consigue una alta energía de homogenización favoreciendo la formación de la emulsión alcanzando, a su vez, la distribución homogénea del fármaco en el sistema (Sah, Toddywala, & Chien, 1995). La síntesis con un 5% de TMX fue la que menos fármaco incorporó, con unas eficiencias de incorporación más bajas (44 – 62%), (*Tabla 24*). En la síntesis con el 20% de TMX, las eficiencias de incorporación estuvieron en todo momento por encima del 100%. Como se observa en las fotografías obtenidas por el microscopio electrónico de barrido (*Figura 43*), hay grandes cristales que no pueden ser debidos al tensioactivo puesto que en las síntesis equivalentes sin TMX no aparecen, por lo que se atribuyen al TMX que no ha sido incluido en el interior del sistema y que ha podido cristalizar fuera de ellas. En este caso (20% TMX), por lo tanto, hay un exceso de TMX que no puede ser incorporado en las partículas ya que se ha alcanzado el punto de saturación (cantidad máxima de moléculas de fármaco que es capaz de acomodarse en una determinada cantidad de la matriz polimérica) (Maji et al., 2014). Este exceso de tamoxifeno no incorporado no es eliminado con los lavados en la etapa de purificación, puesto que se realizan con agua y el TMX es hidrofóbico, ya que esta purificación está destinada a eliminar los restos de tensioactivo. Esto hace que cuando se procede a realizar la extracción no solo se cuantifica el TMX internalizado dando eficiencias de incorporación tan elevadas. Por esta circunstancia se descartó esta concentración de TMX para la síntesis de los sistemas. La concentración más adecuada y por lo tanto la que se seleccionó fue el 10% de TMX. En este caso las fotografías no mostraron cristales fuera de las partículas (*Figura 43 y 44*) y la eficiencia de incorporación fue muy elevada, pero por debajo de 100% y en todos los caso por encima del 80% ( $95 \pm 5$  -  $110 \pm 6$   $\mu\text{g}$  TMX/mg MS) en las tres síntesis (*Tabla 24*). Tanto las NP como las MS son sistemas hidrofóbicos los cuales permiten mejor la encapsulación de fármacos hidrofóbicos como el TMX, mejorando su solubilidad (Sun et al., 2014).

Otra de las modificaciones que se han buscado con este nuevo método de síntesis es la funcionalización de las partículas aumentando la especificidad de la terapia. La funcionalización se ha llevado a cabo solo en los sistemas de tamaño nanométrico (NP y NG) y no en las micropartículas sintetizadas por atomización y secado, puesto que las nanopartículas presentan una mayor incorporación celular comparado con las de un tamaño micrométrico, lo

que hace a las NP y NG mejores candidatos para la vectorización de los sistemas de liberación de fármacos a compartimentos intracelulares específicos (Orive et al., 2004). La superficie de las nanopartículas tiene la ventaja de que se pueden funcionalizar con agentes estabilizadores como el PEG y diversos ligandos (Wang et al., 2012). La funcionalización que se buscó fue doble, con PEG y ácido fólico. Estas moléculas han sido seleccionadas por las ventajas que cada una de ellas proporciona al sistema. El ácido fólico es una molécula de pequeño tamaño, disponibilidad buena, conjugación simple y no inmunogénica (Bazak et al., 2015) comparado con otros ligando. Así mismo, muchas células tumorales epidermales sobreexpresan el receptor de folato, especialmente en cánceres ginecológicos como el cáncer de mama, de ovario y endometrial (Hartmann et al., 2007) (Basal et al., 2009) y otros como el de riñón, pulmón y colon, además es raro encontrarlo en células normales (Liu et al., 2007) (Lu & Low, 2003). Por tanto, la vectorización con esta molécula biológica puede ser un gran avance en la especificidad de la terapia. La otra molécula usada para recubrir las partículas, PEG, es una de las modificaciones más usadas en el recubrimiento de las NP puesto que presenta las siguientes ventajas:

- Disminuye la inmunogenicidad y antigenicidad, ( Liu, Yang, & Ho, 2011)
- Aumenta el tiempo de residencia en el organismo (Kumar & Lutful, 2014)
- Protege a las nanopartículas de la degradación (Sun et al., 2014)
- Disminuye el aclaramiento renal (Kumar & Lutful, 2014)
- Aumenta el equilibrio hidrodinámico facilitando su solubilidad
- Una mayor capacidad de unión y acumulación en algunas dianas
- Capacidad para ser funcionalizadas

Se ha demostrado que las NP de PLGA presentan un elevado grado de opsonización por el sistema retículo endotelial (RES) (Dinarvand, Sepehri, Manoochehri, Rouhani, & Atyabi, 2011) lo que hace que se eliminen rápidamente del organismo, esta limitación es suprimida al cubrirlas con PEG, molécula hidrofílica que no es reconocida por el RES.

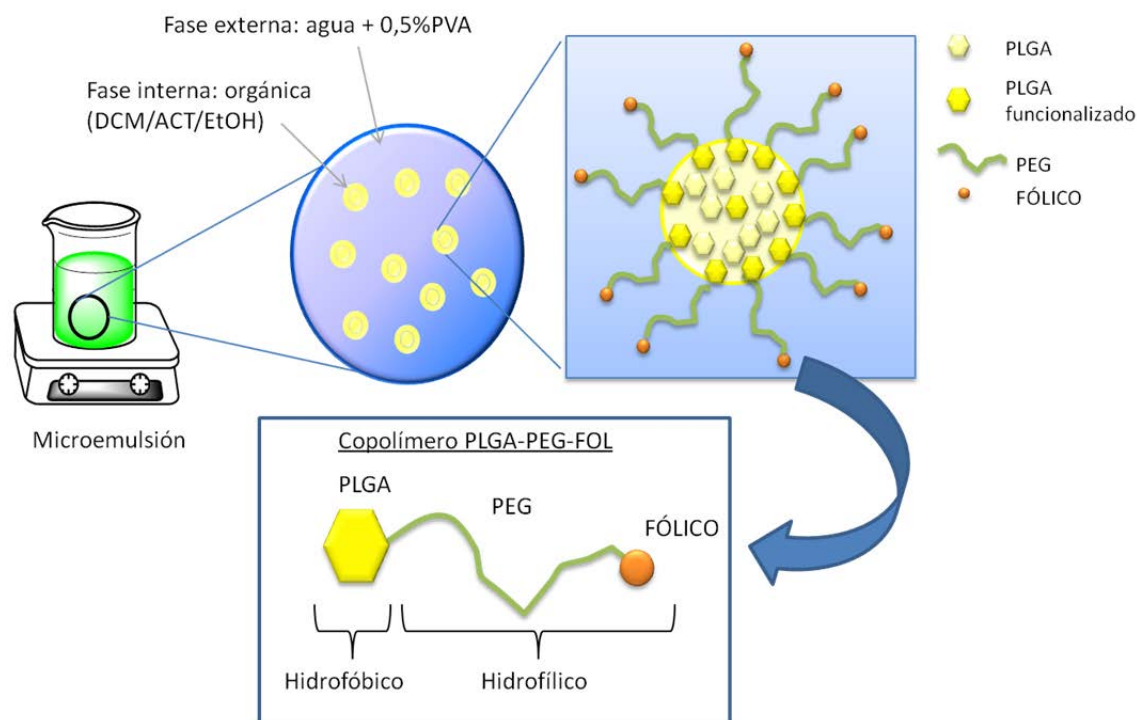
La técnica de emulsión es una técnica que permite una buena incorporación del fármaco durante la síntesis. El TMX y los polímeros son ambos solubles en la fase orgánica (fase interna) estado íntimamente unidos antes la formación de la partícula, lo que permite

que empiecen a interaccionar obteniendo eficiencias de incorporación por encima del 80%. El hecho de que la fase interna sea orgánica (con un menor punto de evaporación), favorece la fase de evaporación y la formación de la partícula.

### **Funcionalización de las nanopartículas con ácido fólico**

Para conseguir esta funcionalización se procedió a unir estas dos moléculas al polímero inicial PLGA sintetizando el polímero PLGA-PEG-FOL. Este nuevo polímero va a presentar características anfifílicas ya que el PEG y el fólico son hidrofílicos mientras que el PLGA hidrofóbico. Es importante que el PEG y el fólico queden orientados hacia fuera de la partícula para que queden en la superficie expuestos consiguiendo el efecto buscado. A través de la técnica de síntesis (emulsión / evaporación) permite fácilmente la funcionalización adecuada ya que en la interfaz, entre la fase interna y externa, se puede colocar los polímeros anfifílicos dejando expuesto hacia la fase externa (acuosa) los grupos polares o las partes más hidrofílicas (PEG y ácido fólico) y dejando en el interior de las gotículas (en la fase interna) la zonas y polímeros hidrofóbicos (PLGA). De esta forma las partículas que se forman presentan un núcleo con el PLGA dejando en la superficie expuesta las moléculas más hidrofílicas (PEG) y la vectora (ácido fólico) (*Figura 77*). La síntesis del copolímero funcionalizado se llevó a cabo de forma exitosa como demuestran los resultados del FTIR (*Figura 39*) en la que se han detectado los grupos funcionales de las tres moléculas confirmando la presencia de todas ellas en el polímero PLGA-PEG-FOL. Para que esta reacción se llevara a cabo fue imprescindible disponer de los polímeros con los grupos funcionales adecuados en los extremos. Por este hecho el PLGA Resomer® juega un papel muy importante al presentar un grupo carboxílico terminal, susceptibles de ser atacados por un nucleófilo previa activación. Así mismo el PEG seleccionado presentaba dos grupos amina terminales siendo los grupos nucleofílicos atacantes. A través de una simple reacción nucleofílica (previa activación del grupo carbonilo con carbodiimida) y añadiendo las concentraciones molares necesarias (poniendo en exceso el PEG) se obtuvo el polímero PLGA-PEG-NH<sub>2</sub>. El PEG obtenido solo está monosustituido dejando libre un grupo amina con el cual se puede hacer la segunda reacción nucleofílica y unirse al ácido fólico. Esta reacción es llevada a cabo gracias a que el ácido fólico presenta dos ácidos carboxílicos terminales, uno de ellos muy cerca del anillo de pteridina cuyo impedimento estérico le impediría reaccionar, y el otro más alejado (con menor impedimento estérico)

sobre el cual (previa activación con una carbodiminda) se realizaría el ataque nucleofílico reaccionando mol a mol ( $111 \pm 43$  µg de Fólico/ g PLGA-PEG-FOL) (Tabla 18).



**Figura 77:** Esquema del copolímero funcionalizado anfifílico y de la síntesis de las nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico a través de una emulsión O/A.

Mediante la técnica de emulsión/ evaporación, por tanto, se han conseguido sintetizar partículas basadas en poliésteres alifáticos de forma satisfactoria tanto funcionalizadas como sin funcionalizar. Presentaron una morfología esférica con la superficie lisa (Figura 44). El rendimiento de la técnica fue mayor en las partículas sin fólico, con una media de 82,35% frente al 44,5% de las partículas vectorizadas (Tabla 16), lo cual puede ser debido a que durante síntesis de las NP vectorizadas, el polímero PLGA-PEG-FOL (con características anfifílicas) puede pasar a la fase acuosa en vez de quedar en la interfaz O/A perdiendo así parte del polímero y disminuyendo el rendimiento de la técnica.

### **Estudio morfológico**

Las partículas sintetizadas por emulsión presentaron un tamaño más pequeño que por atomización y secado puesto que, en la emulsión, las partículas van a presentar un tamaño igual al de las gotículas que forme la fase interna (Xu et al., 2009), mientras que en la atomización y secado el tamaño de las partículas van a depender de las gotículas cuando se atomiza el producto en el seno de un aire caliente y por lo tanto de la boquilla atomizadora del equipo. La ventaja que presentan estos sistemas de menor tamaño es que, debido al tamaño nanométrico tan reducido, la probabilidad de ser eliminadas o aclaradas del organismo por el riñón es menor y por lo tanto aumenta el tiempo de permanencia (Wang et al., 2012), así como una mejor circulación por el torrente sanguíneo pudiendo llegar mejor a la zona tumoral, ya que se ha observado que los vasos tumorales presentan un tamaño de 200 nm o menos (Heslinga et al., 2009) (Shim et al., 2013).

### **Valoración del fólculo unido a las nanopartículas**

El fólculo se unió satisfactoriamente al copolímero PLGA-PEG prácticamente reaccionando mol a mol. A la hora de formar parte de la partícula se observó que el porcentaje de incorporación disminuye bastante. Esto puede deberse al proceso de síntesis. El copolímero con el fólculo se añade a la fase orgánica de la emulsión para que interaccione junto con el resto de polímero que van a formar la partícula en la síntesis. El sistema que significativamente más fólculo incorporó fue el sistema EF-LG50. En este caso el sistema está formado por el polímero PLGA 50/50 que es el mismo polímero usado para el copolímero vectorizado (PLGA50/50-PEG-FOL). Al ser el mismo polímero y presentar las mismas características hidrofílicas, la afinidad entre ellos para formar la partícula final es mayor, lo que hace que aumente la presencia del polímero funcionalizado en el sistema, aumentando la incorporación de fólculo indirectamente. En este sistema se consigue una incorporación del 40% mientras que en los otros dos sistemas este porcentaje disminuye significativamente a 4,3 y 5,5% para EF-LG50:LG75 y EF-LG50:L respectivamente (*Tabla 18*). En este caso los polímeros presentaron una hidrofobicidad mayor (PLGA 75/25 y PLA) frente al copolímero funcionalizado PLGA50/50-PEG-FOL, lo que puede producir una menor interacción en ellos, dejando fuera de la fase interna el polímero más hidrofílico (PLGA-PEG-FOL) y quedando fuera de la síntesis.



### **Estudios termogavimétricos (TGA)**

Con el estudio termogavimétrico se confirma que la síntesis del polímero vectorizado se ha llevado a cabo satisfactoriamente puesto que, el compuesto intermedio PLGA-PEG, presenta dos etapas de degradación (275 y 398°C) que coinciden con las etapas de degradación de los polímeros iniciales, reafirmando la presencia de ambos compuestos. El polímero final sintetizado (PLGA-PEG-FOL) presenta una única etapa de degradación a 520°C por lo que se podría decir que se ha sintetizado un compuesto nuevo al modificar los picos de degradación característicos de los componentes por separado (*Figura 49*).

Al igual que en la técnica de atomización y secado, las temperaturas alcanzadas en la técnica de emulsión / evaporación no alteran la estabilidad de los polímeros ni de las partículas puesto que, como revelan los resultados de la TGA, tanto los polímeros como las partículas son estables hasta temperaturas por encima de los 200°C y el fólico hasta los 95°C. Estas temperaturas nunca son alcanzadas durante la síntesis, la cual se realiza a temperatura ambiente.

Las nanopartículas presentan un único evento térmico (*Tabla 21*) a las mismas temperaturas a la cual se produce la degradación térmica de las microesferas basadas en poliésteres alifáticos sintetizadas por atomización y secado (*Tabla 20*), próximo a 300°C, como corresponde a las partículas cuya composición copolimérica es la misma. Teniendo en cuenta que el método de síntesis es diferente, los resultados de la estabilidad térmica son similares por lo que se puede decir que, la emulsión / evaporación no altera a las características y estabilidad de los polímeros. Los sistemas con TMX vuelven a presentar una mayor estabilidad al tener una mayor temperatura de degradación térmica comparado con las partículas sin TMX. Esta diferencia se hace mucho más notable en los sistemas más hidrofílicos (E-LG50) pasando una degradación a 275,8°C sin fármaco a 316,6°C con fármaco (*Tabla 21*). Este efecto hace pensar que el fármaco (hidrofóbico) produce cierta estabilización térmica sobre todo en las partículas hidrofílicas. Como ya se ha comentado, la estabilidad depende de los materiales que forman el sistema, ya que cuando se cambió la composición polimérica añadiendo el polímero PLGA-PEG-FOL, se observó un cambio en el comportamiento térmico presentando varios eventos térmicos, no solo uno. Las nanopartículas vectorizadas sin fármaco presentan un único evento térmico a una mayor temperatura (316,6 – 369,1°C) que sus NP homólogas sin vectorizar (275,8 – 305°C). Además, en este caso ocurre lo contrario, cuando se incorporó el fármaco disminuyó la temperatura de los eventos térmicos a 240,8 – 246,6°C haciendo a las

partículas menos estables y con un tercer evento a 398°C (*Tabla 21*). La primera pérdida de masa se produce a unos 240°C lo que coincide con la temperatura de degradación del ácido fólico. El segundo evento térmico (305 – 322,5°C) es muy próximo a los valores del PLGA resomer® y la tercera pérdida de masa, a 398°C, coincide con el segundo evento del copolímero PLGA-PEG y el PEG. Estos datos confirman que el nuevo polímero PLGA-PEG-FOL está presente en los sistemas y se ha integrado satisfactoriamente. Como ya se ha comentado, en las partículas sin funcionalizar, el fármaco interacciona con los polímeros de tipo poliéster alifáticos haciendo que la partícula se degrade en un único evento térmico a una temperatura superior produciendo una estabilización del sistema. Sin embargo, al introducir un polímero con características diferentes (PLGA-PEG-FOL) produce partículas con perfil fisicoquímico muy distinto alterando la estabilidad térmica. En estos sistemas vectorizados la presencia del fármaco sigue produciendo una interacción hidrofóbica con la parte hidrofóbica del polímero (PLGA) lo que hace que, cuando éstas partículas no contienen fármaco, presentaron, en dos de las tres composiciones, un único evento térmico mientras que, cuando se incorporó el TMX, se diferenció tres eventos que coincidían con los de fólico, PLGA y PEG. Analizando más estos valores, se observa que el primer evento y el tercero coinciden perfectamente con el ácido fólico y el PEG respectivamente, mientras que el segundo evento se aproxima con el del PLGA pero presenta un valor superior debido a la interacción con el TMX. Esta interacción solo ocurre con el PLGA y no con el PEG o el ácido fólico debido a las características hidrofílicas de estos dos últimos compuestos, mientras que el PLGA y el TMX presentan unas características más hidrofóbicas.

### **Estudios de liberación del TMX a partir de los sistemas**

A través de los ensayos de liberación se ha podido valorar el control que ejercen estos sistemas sobre la salida del fármaco. Este parámetro se ha estudiado en los sistemas seleccionados, preparados a partir de 10% TMX sin funcionalizar y funcionalizados así como los sistemas preparados a partir de 5% de TMX, para evaluar si el parámetro de la cantidad de fármaco encapsulada influye en la liberación. Como ha mostrado el estudio morfológico, las partículas son mucho más pequeñas que las sintetizadas por atomización y secado, alcanzando tamaños nanométricos y homodispersos, lo que hace que la liberación del fármaco sea mucho más rápida, y en todos los casos se consigue liberar el 100% del fármaco encapsulado. Los sistemas que más controlaron la liberación en el tiempo, fueron las NP sin

funcionalizar y 10% de TMX, al presentar una mayor incorporación de fármaco, prolongaron la liberación frente a los sistemas 5% de TMX. Comparando ambas liberaciones, la cantidad del fármaco incorporado es un factor que determina el perfil de liberación, ya que no solo afecta a la cantidad máxima liberada y al tiempo de liberación (*Tabla 27*) sino que también altera la velocidad de liberación (*Tabla 30*). Si se observa la primera etapa, donde se produce la mayor salida del fármaco, los sistemas 5% TMX, presentaron una liberación más lenta ( $26,8 - 45 \mu\text{g TMX} / \text{h}$ ) mientras que, cuando se duplico la cantidad de fármaco en la síntesis (10% TMX), la velocidad se vio aumentada a  $53,2 - 79,4 \mu\text{g TMX} / \text{h}$ . A mayor cantidad de fármaco incorporado en las partículas, más tiempo tarda en liberar el contenido con mayores concentraciones alcanzadas y con velocidades de liberación aumentadas (Burgess & Hickey, 2007). Aunque las NP 10% TMX sin funcionalizar presentaron prácticamente el mismo tiempo de liberación (79h) (*Tabla 27*), sí que se observa que el perfil de liberación varía en función de la composición polimérica y de la eficiencia de encapsulación, produciendo una cinética más rápida en los sistemas más hidrofílicos en la segunda y tercera etapa. Sin embargo en la primera etapa, el sistema que más rápido libera es el más hidrofóbico E-LG75:L ( $79,4 \mu\text{g TMX} / \text{h}$ ) (*Tabla 30*) ya que es el sistema que presentó un menor tamaño (72 nm) (*Tabla 16*). Además, como se ha demostrado en anteriores estudios con la atomización y secado, el PLA puede tener una cierta competición con el fármaco para formar parte de la partícula quedando, este último, más en la superficie, lo que favorecería su liberación más rápida. Esto confirma que en la liberación no solo afecta la composición polimérica sino que también se ve alterado por el tamaño de partícula, lo cual influencia significativamente en la velocidad de liberación (Narayani & Rao, 1996) (Bezemer et al., 2000). Cuando la liberación es controlada por un proceso de difusión, un tamaño menor incrementa la superficie específica y disminuye la distancia de difusión aumentando la velocidad de salida del fármaco (Berkland, King, Cox, Kim, & Pack, 2002), mientras que si el proceso limitante es la erosión, es entonces cuando otros aspectos entran en juego como la distribución y velocidad de degradación del polímero (Berkland, Kim, & Pack, 2004). Como se observa en el modelo matemático de Higuchi, es precisamente este sistema (E-LG75:L) (el sistema de menor tamaño con 72 nm), el que presenta una mayor constante de difusión ( $57,48 \text{ h}^{1/2}$ ) (*Tabla 33*). Cuando se utilizó el polímero funcionalizado, PLGA-PEG-FOL (anfifílico), el comportamiento de liberación varió. Se observa que hay una salida rápida inicial del fármaco durante los primeros 20 minutos (0,33h), en los sistemas más hidrofílicos (EF-LG50 y EF-LG50:LG75). Analizando la liberación más detenidamente, se ha detectado que estos dos sistemas liberan el 77 – 73% en esos primeros 20 minutos (*Tabla 33*) lo que se puede considerar como un *efecto burst*. Se considera un efecto

burst cuando se libera una elevada cantidad en un corto periodo de tiempo. Hay que tener en cuenta que el polímero PLGA resomer®, que forma parte de las NP funcionalizadas, es un PLGA con grupos carboxílicos terminales y con menor peso molecular. Se ha comprobado que estos PLGA se hinchan mucho más que sus análogos con grupos etilo terminales produciendo un mayor *efecto burst* (Wischke, Zhang, Mittal, & Schwendeman, 2010). Además, el incremento de la hidrofília en el sistema a través de la funcionalización con el PEG, contribuye a reducir la presencia del fármaco asociado a la superficie favoreciendo su rápida salida (Li et al., 2001) en forma de burst. El recubrimiento de PEG y fólico hace a la partícula más hidrofílica haciéndola más susceptible de ser atacada y degradada por el medio acuoso. A todos estas circunstancias se le suma la presencia de SDS en el medio de liberación que, como ya se ha comentado favorece mucho la salida del fármaco y su solubilización. Todo esto demuestra la importancia y relevancia que presenta los tipos de polímeros que forman la partícula. Cabe destacar que superficies hidrofílicas incrementan la resistencia a la adsorción de proteínas plasmáticas evitando así la captación por los macrófagos (K. Yang & Ma, 2010). Este efecto se consigue simplemente con el recubrimiento con la molécula PEG, sin embargo se ha demostrado que puede también evitar la incorporación celular del sistema, lo cual es una epata critica para la eficacia de la liberación del fármaco (Remaut, Lucas, Braeckmans, Demeester, & De Smedt, 2007), es por ello que los sistemas además se recubrieron con ácido fólico, lo que proporciona el reconocimiento ligando – receptor y favoreciendo la inclusión celular.

Por lo tanto, la liberación se puede ver afectada por diversos parámetros como son el tamaño de la partícula (Shim et al., 2013), pero también por las características y composición del polímero, mecanismo de liberación, medio en el que se encuentra y la cantidad de fármaco incorporado en el sistema.

Si se compara las velocidades de liberación de TMX de los sistemas sin funcionalizar preparados a partir de 10% TMX (*Tabla 30*), con las velocidades de liberación de los sistemas sintetizados por atomización y secado (*Tabla 29*), se observa que son similares puesto que se componen de los mismos polímeros con el mismo peso molecular. Sin embargo sí que son ligeramente más elevadas las obtenidas con las nanopartículas, puesto que presentan un menor tamaño y una mayor superficie específica.

### **Aplicación de los modelos matemáticos**

Las nanopartículas sintetizadas por emulsión se han ajustado a tres modelos matemáticos que determinan los procesos por los cuales se produce la liberación (*Tabla 33*) y que se correlacionan con las velocidades y las cinéticas de liberación. A través del modelo de Higuchi se demuestra que hay un proceso de difusión en todos los sistemas pero no es el único proceso ya que solo se ajusta hasta el 71 – 89% liberado. Esta difusión es mayor en los sistemas 10% TMX sin funcionalizar puesto que presentaban una mayor cantidad de fármaco en su interior. EL sistema E-LG57:L es el que presenta una mayor constante de difusión debido a que es el sistema más pequeño y como se ha comentado antes, se incrementa la superficie específica y la difusión. Cuando se estudió el modelo de Korsmeyer-Peppas no se puede concluir si hay un proceso de difusión o hinchamiento ya que todos los valores de “ $n$ ” están por debajo de 0,43, valor estipulado por el modelo para partículas con una geometría esférica. A través de los años ha quedado demostrado que los polímeros  $\alpha$ -ortoésteres como son los PLGA presentan procesos de degradación. Es por ello que el modelo de Hopfenberg también presenta buenas correlaciones en estas cinéticas de liberación ya que se basa en la erosión. Se ha observado que la lenta hidrólisis de las uniones éster de las moléculas de PLGA se lleva a cabo en tres fases (Mukherjee, Roy, Santra, & Sahana, 2010) lo que pueden hacer que haya diferentes etapas de liberación, como se detecta al aplicar el modelo de Hopfenberg. En condiciones fisiológicas, el PLGA tiene una degradación inicial que se centra en la ruptura de las cadenas produciendo mayoritariamente oligómeros, seguida de una disminución del peso molecular con una mayor pérdida de masa y finalmente la conversión de los oligómeros en monómeros solubles produciendo la solubilización completa (Maji et al., 2014). Es por ello que al aplicar el modelo de Hopferberg se diferencian dos etapas, la primera presentando valores de K superiores a la segunda etapa, en el caso de los sistemas sin funcionalizar 10% TMX. Los sistemas funcionalizados (NP-F) solo presentaron una única etapa lo que puede deberse a la composición polimérica. El PLGA resomer® que presenta terminales carboxílicos y un menor peso molecular, así como la presencia del PEG y fólico en la superficie lo que hace a la partícula más hidrofílica y favorece su degradación en una única etapa cinética. Estos sistemas en los cuales está bien definido el proceso y perfil de degradación pueden tener un mayor control de la liberación (Sun et al., 2011).

### **Estudios en cultivos celulares**

Se comprobó la biocompatibilidad, eficacia terapéutica y el efecto de la funcionalización en líneas celulares con receptores positivos de folato (HeLa, T47D y MCF7) (Martinez et al., 2014).

Todas nanopartículas sintetizadas por emulsión son citocompatibles, puesto que por sí solas no presentan citotoxicidad en las tres líneas celulares, consiguiendo una viabilidad celular por encima del 80% al sexto día. Sin embargo, se detecta una ligera bajada de la viabilidad a tiempos cortos (1<sup>er</sup> y 3<sup>er</sup> día) debido a la posible inclusión de las partículas en las células, que se ve favorecido por el tamaño nanométrico (*Figuras 55, 56, 57*). Este descenso de la viabilidad celular no es debido a la toxicidad ya que al 6<sup>o</sup> día (a tiempos largos) el cultivo celular se recupera, no produciendo la muerte de las células. El TMX incorporado en las NP ha demostrado efectividad frente a las tres líneas células al disminuir la viabilidad tanto a 6  $\mu$ M como a 10  $\mu$ M. Puesto que las partículas no son citotóxicas y que la muerte celular en las tres líneas es progresiva en el tiempo, esta disminución de la viabilidad celular es producida exclusivamente por el fármaco y su liberación desde los sistemas. La actividad del TMX es dosis dependiente y así lo demuestran las partículas ya que al aumentar la concentración de 6  $\mu$ M a 10  $\mu$ M se observa una mayor disminución en la viabilidad celular en las tres líneas celulares. Al aumentar la concentración de las partículas en el medio, se aumenta también la dosis y por lo tanto se produce una disminución mayor de la viabilidad celular. En todos los casos se observa que a medida que pasa el tiempo esta muerte celular va aumentando, lo que demuestra que la actividad es tiempo dependiente debido a la progresiva liberación del fármaco desde los sistemas, confirmando el control de la liberación.

Las células HeLa y T47D son las que mostraron una mayor sensibilidad al tratamiento con TMX puesto que a 10  $\mu$ M de fármaco en disolución, se produce una total muerte celular al 3<sup>er</sup> día. Las células T47D presentan receptores de estrógenos y por lo tanto sensible al fármaco, sin embargo las células HeLa es una línea celular sin estos receptores pero se ha demostrado que el tamoxifeno puede tener acción, en este caso, a través de la activación de diferentes MAPKs (ERK2 y JUN1) (Duh, 1997). Las MAPKs juegan un papel primordial en la fosforilación y activación de varios factores de la transcripción así como en la apoptosis. Hay que tener en cuenta además, que las células HeLa, fueron sembradas a una densidad inferior debido a su elevada tasa de crecimiento, pero el cultivo estuvo expuesto a la misma cantidad de fármaco

(10 y 6  $\mu\text{M}$ ), siendo superior la dosis de TMX expuesto por célula, produciendo una mayor muerte celular ya que la acción citotóxica es dosis dependiente.

En el caso de la línea celular HeLa, los sistemas mejoraron la eficacia terapéutica al producir un mayor descenso de la viabilidad celular que el fármaco en disolución a 6  $\mu\text{M}$ . Cuando los sistemas se funcionalizaron, se incrementó todavía más la efectividad, consiguiendo una muerte total del cultivo al 3<sup>er</sup> día a la dosis 6  $\mu\text{M}$  (*Figura 55*). Confirmando el incremento de la internalización celular de los sistemas mediada por receptores ya que las células Hela son positiva para los receptores de folato.

En la línea celular T47D (*Figura 57*), los sistemas presentan la misma actividad que el fármaco en disolución tanto a 6 como a 10  $\mu\text{M}$  (excepto el sistema E-LG50:LG75, que presentó una menor actividad). Cuando los sistemas se funcionalizaron se mejoró la acción disminuyendo la viabilidad celular por debajo de la del propio fármaco en disolución, produciendo muerte celular al tercer día en ambas concentraciones 6 y 10  $\mu\text{M}$ , lo que también indican una mayor internalización, lo que favorece la acción del fármaco intracelularmente, ya que las células T47D son positivas para los receptores de estrógenos.

Las MCF7 son las más resistentes al tratamiento ya que con el TMX en disolución a 10  $\mu\text{M}$  se consigue disminuir la viabilidad a 24%. Esto puede ser debido a que a pesar de que es una línea celular que presenta receptores de estrógenos también han desarrollado resistencias a este fármaco. También en esta línea se ha conseguido mejorar la eficacia del fármaco con los sistemas E-LG50 y E-LG75:L, ya que se alcanza la muerte celular al 6<sup>o</sup> día a la concentración de 10  $\mu\text{M}$ . Igual que en las dos anteriores líneas celulares, cuando los sistemas se funcionalizaron con fólido se incrementó el descenso de la viabilidad celular (*Figura 56*) ya que las MCF7 también presentan receptores de folato, mejorando su internalización y acción.

Cabe destacar que en la mayoría de los casos, los resultados obtenidos están en concordancia con los ensayos de liberación in vitro, de tal forma que, el sistema que más rápido liberó (E-LG75:L) (79,43  $\mu\text{g}$  TMX / h) (*Tabla 30*), es el que produce una mayor muerte celular seguido del sistema E-LG50:LG75 y después el sistema E-LG50. En las tres líneas celulares (positivas para receptores de fólido) la mayor acción se consigue con los sistemas funcionalizados con fólido, como se ha comentado, puede deberse a la internalización y acumulación del fármaco intracelular favorecido por la inclusión de las NP (Li et al., 2008) (Zhang et al., 2007). Muchos estudios han demostrado que las NP con ligandos específicos a

receptores presentan una mayor citotoxicidad debido a un aumento de la incorporación celular y unión celular (Cho et al., 2013). , Liu y cols demostró que las nanopartículas funcionalizadas con fólico son más tóxicas (Liu et al., 2007). Profundizando más, como se ha demostrado anteriormente, el sistema que más fólico incorporó en la superficie fue el EF-LG50 (con un 40% de ácido fólico) (*Tabla 18*) mientras que los otros sistemas solo incorporaron entre 4 y 5%. Debido a esta diferencia, se observa que entre los sistemas funcionalizados, el que produce una mayor muerte celular es el sistema EF-LG50 produciendo la muerte casi total desde el primer día en las tres líneas celulares, a 6  $\mu$ M, lo que demuestra una mayor efectividad debida probablemente a su mayor funcionalización.

Con los estudios de viabilidad se ha observado como las partículas funcionalizadas presentan una mejora en la efectividad del fármaco al producir una mayor muerte celular. A través de los estudios de incorporación se puede demostrar que este incremento de la eficacia es realmente debida a una incorporación en el interior celular de las partículas. Para comprobar la internalización en las células, se han realizado estudios de incorporación celular mediante una sustancia marcadora fluorescente como es la 6-coumarina (*Figura 61, 62, 63*). La incorporación celular va a depender de la línea celular y si presenta receptores específicos en su superficie, del tipo de partícula, de la funcionalización de la partícula y del tiempo de exposición.

En las tres líneas celulares se ha observado que el tiempo máximo de internalización tiene lugar a las 24h.

El sistema E-LG50 aumenta significativamente la incorporación celular, en todos los casos, a las 24h. Sin embargo no parece haber un incremento significativo en la incorporación celular cuando los sistemas se funcionalizaron. Esto demuestra que a pesar de que las partículas E-LG50 tuvieran una mayor proporción de ácido fólico (40%) no parece que haya una incorporación celular a través de este receptor de folato en las células, sino por otro mecanismo independiente de receptor. Las partículas E-LG50:LG75 presentaron una incorporación significativamente superior a las E-LG50 y se aprecia un incremento en la internalización cuando los sistemas se funcionalizaron en las tres líneas celulares. Esto se confirma con la inhibición de los receptores ya que disminuye la internalización cuando se bloquean dichos receptores reafirmando la internalización por este mecanismo. En el caso del tercer sistema EF-LG50:L tampoco se aprecian grandes diferencias en la incorporación celular



entre los sistemas funcionalizados y sin funcionalizar. Sin embargo en los estudios de inhibición con fólico (Figura 67) si se aprecia el efecto de la funcionalización en HeLa y MCF7.

**Tabla 36:** Incorporación celular a las 2h de las diferentes nanopartículas funcionalizadas sintetizadas por emulsión/evaporación en células con receptores de folato inhibidas y sin inhibir por folato en disolución.

NANOPARTÍCULA	LINEA CELULAR	Sin funcionalizar (2h)	Funcionalizados (2h)	Incorporación celular con inhibición
EF-LG50	T47D	$3,5 \pm 0,5$	$4,70 \pm 0,19$	$5,41 \pm 0,46$
	MCF7 <sup>a</sup>	$3,6 \pm 0,33$	$3,59 \pm 0,27$	$5,34 \pm 0,31$
	HELA	$2 \pm 0,15$	$2,29 \pm 0,58$	$3,31 \pm 0,19$
EF-LG50:LG75	T47D <sup>a</sup>	$6,6 \pm 0,32$	$20,20 \pm 0,56$	$7,48 \pm 0,78$
	MCF7 <sup>a</sup>	$12,66 \pm 0,55$	$26,37 \pm 1,72$	$10,8 \pm 0,96$
	HELA <sup>a</sup>	$8,5 \pm 0,95$	$15,10 \pm 0,81$	$5,39 \pm 0,14$
EF-LG50:L	T47D	$4,20 \pm 0,64$	$4,10 \pm 0,51$	$4,25 \pm 0,72$
	MCF7 <sup>a</sup>	$9,9 \pm 0,5$	$8,7 \pm 1,16$	$4,09 \pm 0,51$
	HELA <sup>a</sup>	$8,6 \pm 0,19$	$6,44 \pm 0,3$	$3,27 \pm 0,28$

<sup>a</sup> Existen diferencias significativas entre la incorporación celular de los sistemas funcionalizados en células con receptores de folato sin inhibir y células con los receptores bloqueados.

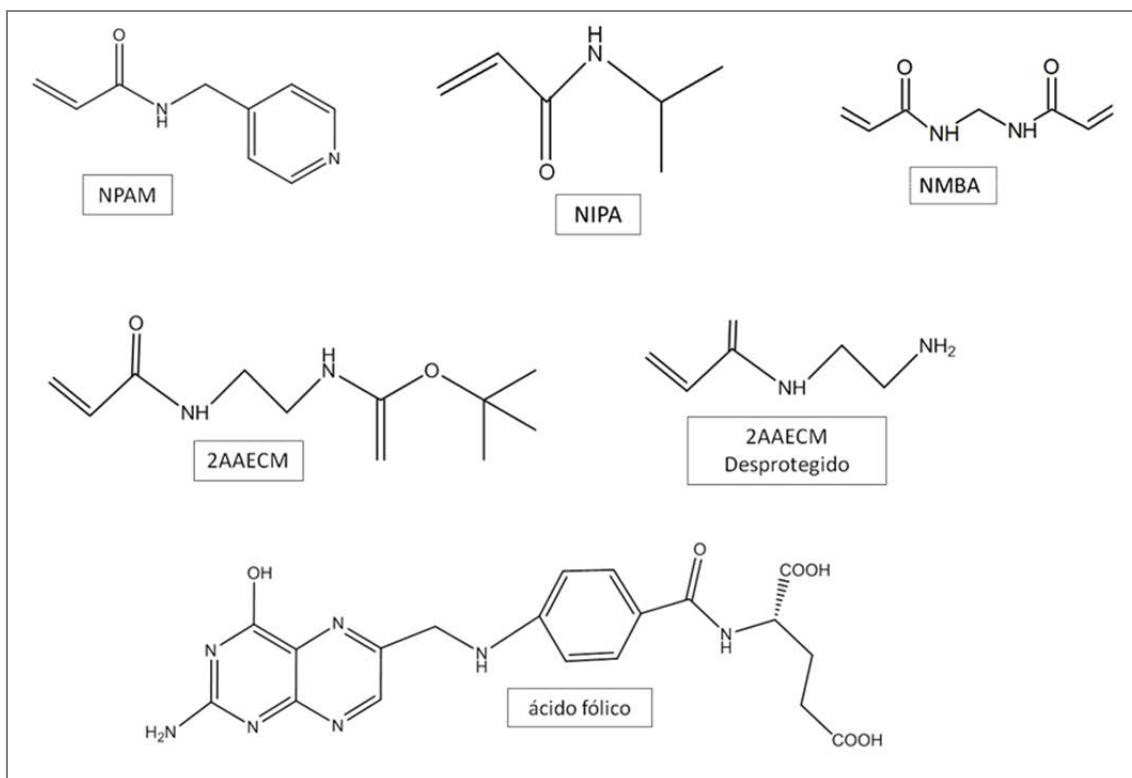
### 3.- NANOHIDROGELES SINTETIZADOS POR POLIMERIZACIÓN RADICALARIA

Los nanohidrogeles son otro sistema de liberación controlada que pueden presentar múltiples características entre las cuales destaca la capacidad para ser funcionalizados y su capacidad para hincharse o colapsarse en función a determinados estímulos externos. Estas dos características junto con el tamaño nanométrico proporcionan una gran ventaja terapéutica en la administración de fármacos. La sensibilidad a un estímulo externo u a otro

viene determinada por los monómeros. A día de hoy se han descrito múltiples monómeros y polímeros susceptibles de formar parte de un sistema de liberación controlada, que presentan sensibilidad a diferentes señales del medio.

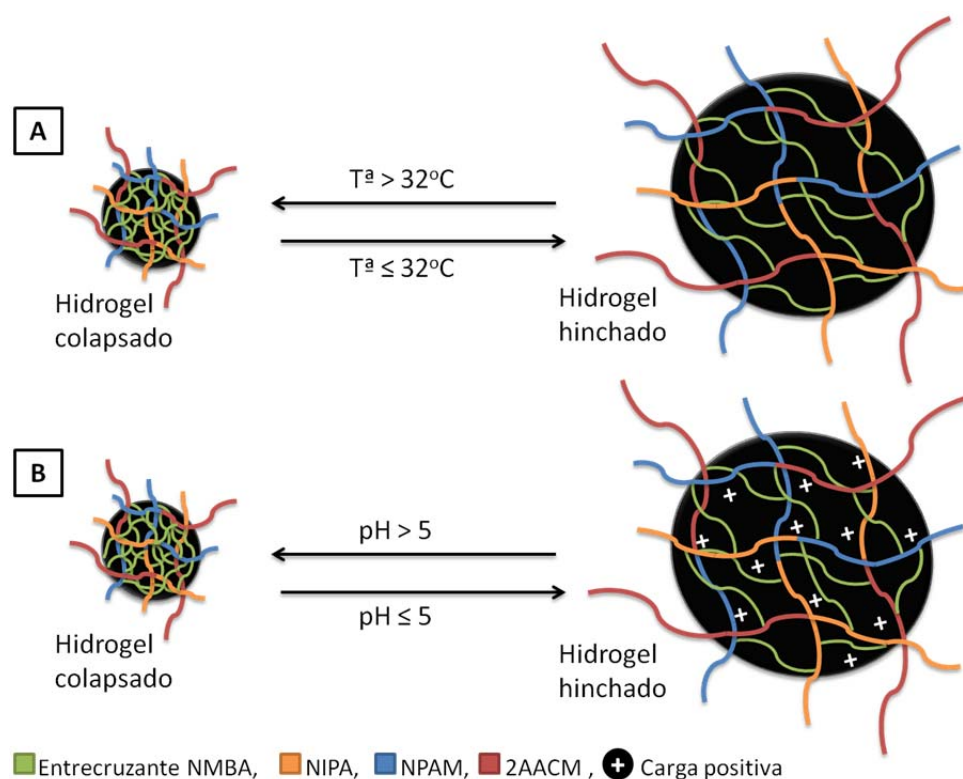
Los sistemas sintetizados se han diseñado para administrar un fármaco cuya diana terapéutica son las células tumorales de cáncer de mama. Como ya se ha descrito anteriormente, los cánceres presentan una serie de características fisiológicas que se pueden aprovechar para conseguir tratamiento mucho más dirigido, específico y eficaz. Entre las características que pueden ser favorables a la liberación del fármaco están: la presencia de receptores específicos, la formación de vasos desestructurados debido a la angiogénesis incontrolada y una variación de pH en el microambiente tumoral. Las células tumorales presentan un pH acidificado (Du et al., 2014; Kumar & Lutful, 2014) debido a su elevada proliferación, baja diferenciación, elevado metabolismo y la disminución del aclaramiento por el sistema linfático. Este pH ácido es un factor ambiental específico de la zona tumoral a la cual se puede hacer sensible las partículas a través de un determinado monómero.

Es imprescindible, por tanto, seleccionar los monómeros más adecuados para formar parte del sistema y conferirle de las características más adecuadas. Por ello se seleccionaron los monómeros NPAM, NIPA y 2AAECM (*Figura 78*). El NPAM es un monómero catiónico con un pH crítico de 5. Esto significa que por debajo de este pH ácido se produce la protonación de los grupos funcionales (piridina) produciendo una repulsión de cargas positivas en la matriz polimérica y como consecuencia el hinchamiento del sistema (*Figura 79 B*). Este monómero es el más adecuado por tanto para conseguir una liberación lisosomal, en el interior celular (con pH ácido), o en el medio tumoral que presenta un pH ácido. Sin embargo este monómero no se encuentra comercializado y por eso se procedió a su síntesis y caracterización. Este monómero presenta dos nitrógenos (amida y una amina aromática) susceptibles de ser protonadas, sin embargo solo se protona el nitrógeno de la piridina con un pKa entre 5,1 – 5,2, que es lo que le proporciona el pH crítico tan bajo al monómero. La amida es menos básica y el par de electrones está en resonancia con el carbonilo no estando tan disponibles, mientras que el par de electrones de la amina aromática se encuentran en un orbital  $sp^2$  disponibles fuera del plano del anillo y por lo tanto siendo más susceptibles a la protonación.



**Figura 78:** Estructuras químicas de los monómeros y compuestos utilizados para la formación de los NG.

Además se buscó un control todavía mayor de la liberación con un segundo factor, la temperatura. Para este efecto se seleccionó el monómero NIPA (Figura 78), es termosensible con una temperatura crítica de 32°C (LCST, low critical solution temperatura). Esto implica que por debajo de estos grados celsius el polímero produce un incremento e hinchamiento del sistema (Figura 79 A). De esta forma se puede trabajar con ellos por debajo de 32°C para conseguir un máximo de hinchamiento y lograr la máxima encapsulación del fármaco, mientras que, cuando se administre en el organismo (36 – 37°C), se encuentre colapsado evitando la salida del fármaco de forma brusca. Así mismo, el fármaco permanece en el interior de las partículas sin ser liberado ni ejercer ninguna acción hasta que el sistema alcance la diana terapéutica, que como ya se ha comentado, se encuentra a pH inferior y es entonces cuando el sistema se hincha de forma parcial (gracias al monómero NPAM) y permite liberar el TMX. Asimismo se permite controlar mejor la liberación puesto que el sistema en el organismo nunca se va hinchar completamente (hinchado por el efecto del NPAM pero parte colapsado por el efecto de la NIPA) evitando la salida rápida del fármaco, y controlando la salida paulatinamente.

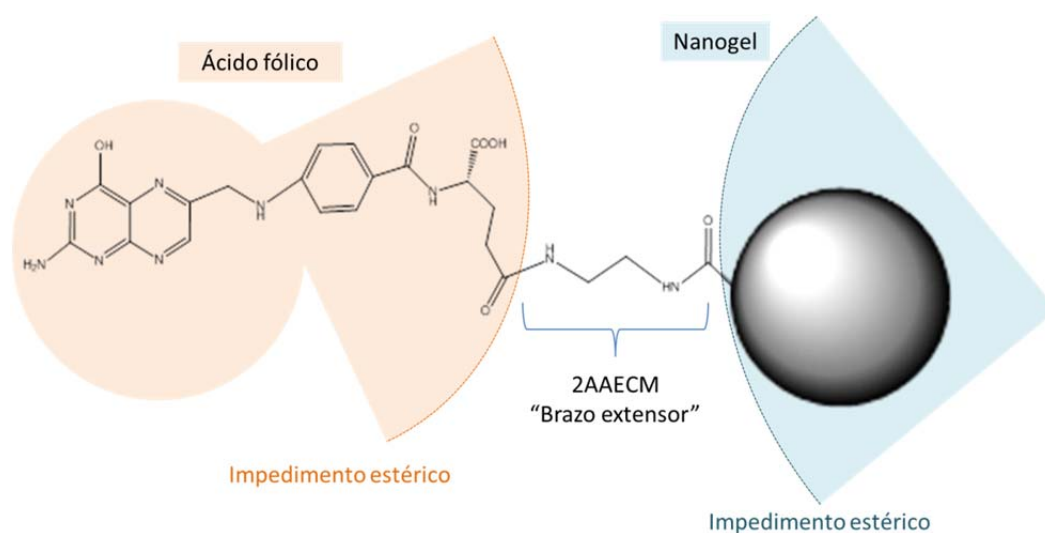


**Figura 79:** Representación del hinchamiento de un nanohidrogel pH y Temperatura dependiente de composición monomérica: NIPA, NPAM, 2AACM y NMBA como entrecruzante. A) Hinchamiento controlado por el monómero NIPA, debido a cambios de temperatura. B) Hinchamiento controlado por el monómero NPAM, debido a cambios de pH.

El NIPA es un monómero altamente caracterizado, estudiado y muy utilizado (Yoshida & Okano, 2010) que se encuentra comercializado y por ello no hizo falta sintetizarlo pero si se procedió a su caracterización a través del FTIR para verificar la presencia de los grupos funcionales más relevantes y confirmar así la precisión de la técnica y la presencia de este monómero en el nanogel (NG) final. La tercera y última característica que se ha buscado en la síntesis de los nanohidrogeles es la funcionalización con ácido fólico buscando una mayor selectividad en la terapia puesto que muchos de los tumores sobre expresan receptores de folato en la membrana (Minko, 2012). Para conseguir unir esta molécula en la superficie de la partícula se ha precisado de un monómero en cuyo extremo haya un grupo funcional nucleófilo que pueda reaccionar con los grupos carboxílicos del ácido fólico para unirlos mediante un enlace covalente. Otro de los aspectos a tener en cuenta, para llevar a cabo esta reacción, es el impedimento estérico. El ácido fólico es una molécula muy voluminosa y el nanohidrogel está formado por muchos monómero con diversos grupos también voluminosos, por lo que, para poder favorecer la unión de dos grupo, primero hay que sortear ese impedimento estérico que se puede producir al aproximarlos. Por todo esto se ha necesitado

que, el monómero que presente un extremo libre con un grupo nucleofílico, sea de una determinada longitud molecular, de tal forma que salga del nanohidrogel como un “brazo extensor” hacia el exterior y que mantenga la distancia entre el NG y el ácido fólico favoreciendo su unión, al disminuir el impedimento estérico (*Figura 80*). El monómero seleccionado para este fin fue el 2AAECM (*Figura 78*) que presento dichas características. Este monómero no se encuentra comercializado por lo que se procedió a su síntesis y caracterización en el laboratorio. En definitiva fueron dos los monómeros sintetizados (NPAM y 2AAECM) (*Figura 23, 24 y 26*).

En ambas síntesis monoméricas uno de los precursores utilizados fue el cloruro de acrililo. Este precursor es fundamental puesto que va a proporcionar, a ambos monómeros, una estructura acrílica (dos dobles enlaces consecutivos) fundamental para producirse una polimerización radicalaria y reaccionar con los demás monómeros para formar el NG. Además hay que tener en cuenta que, para la síntesis del 2AAECM, es imprescindible realizarla en dos pasos, sintetizando inicialmente el producto intermedio NH-BOC (*Figura 23*). Este primer paso es muy importante para conseguir proteger uno de los dos grupos amina que presenta el etilendiamina, y que no reaccione con el cloruro de acrililo, dejando el otro libre para interactuar con el ácido fólico (*Figura 28*).



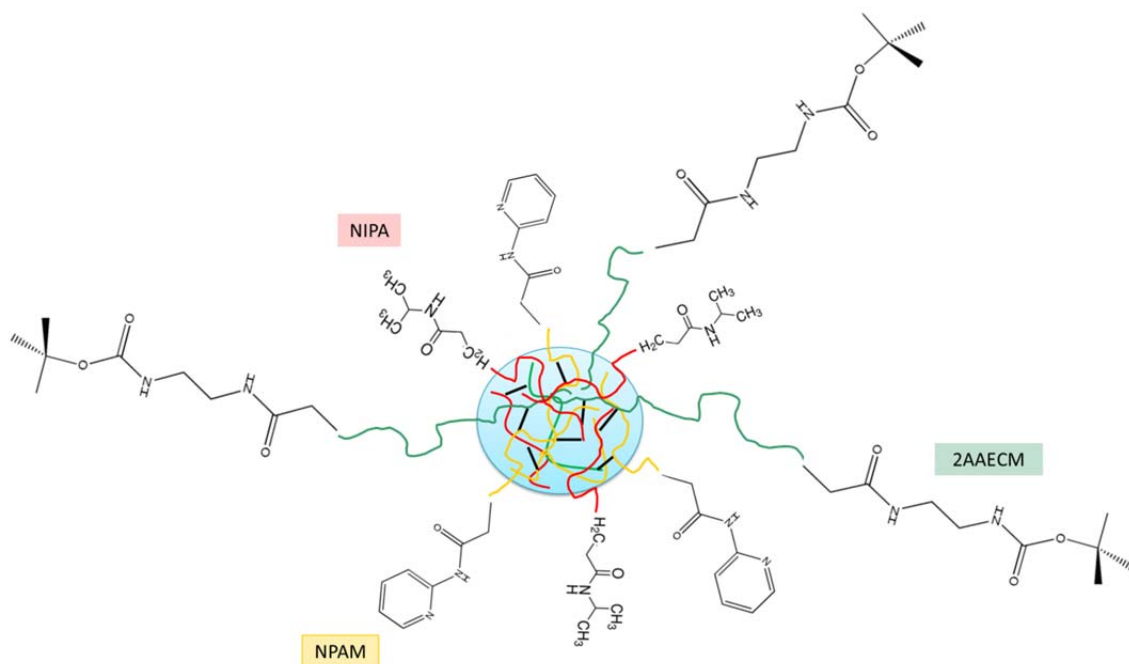
**Figura 80:** Esquema del impedimento estérico entre el fólico y el nanohidrogel y como el monómero 2AAECM disminuye dicho impedimento al separar ambos elementos.

Los resultados del FTIR y de la  $^1\text{H}$ -RMN demuestran que, la síntesis de los monómeros se llevó a cabo de forma satisfactoria revelando los grupos funcionales buscados en su estructura. Ambos monómeros sintetizados presentaron en la estructura el grupo acrílico necesario para la reacción de polimerización, el 2AAECM presenta un grupo amina terminal hacia fuera de la estructura siendo susceptible de reaccionar con el fólico y el monómero NPAM presenta un nitrógeno (en la piridina) en su estructura susceptible de ser protonado en medio ácido (*Figura 40 y Figura 41*).

### **Síntesis de los nanogeles**

Mediante la técnica de polimerización se ha conseguido sintetizar nanohidrogeles del tamaño de nanómetros comprendidos entre  $37 \pm 9 - 265 \pm 72$  nm (*Tabla 17*). Para alcanzar este tamaño tan pequeño es muy importante que la polimerización se realice en el seno de una microemulsión, de tal forma que la reacción tiene lugar en la fase interna de la emulsión y las partículas adquirirán el tamaño de la gotícula donde se han formado. Para la formación de la emulsión y su estabilización es primordial la selección del sistema de tensioactivo más adecuada. En este caso se ha seleccionado el ATLAS G-1086 (polietilen glicol sorbitol hexaoleate) ya que es de tipo no iónico con un valor de HLB de 10 que forma emulsiones O/A, y como co-tensioactivo se añadió el ARLACEL 83 (sorbitan sesquioleate) también no iónico con un valor de HLB de 3,7. Ambos tensioactivos al ser no iónicos son menos agresivos e irritantes. Se han realizado 4 síntesis (NG-80.10.10.5X, NG-80.10.10.7X, NG-83.7.10.5X, NG-83.7.10.7X) variando la proporción de la composición polimérica de NPAM, NIPA y entrecruzante (NMBA) (*Tabla 8*), dejando constante el porcentaje del 2AAECM (*Figura 81*). Aparentemente no hay relación entre el tamaño de los NG obtenidos y la proporción de la composición polimérica o el porcentaje de entrecruzante. Sí que se aprecia un aumento del tamaño en aquellas partículas en las que se incorporó el fólico (*Tabla 17*), lo cual puede ser debido a que la unión del fólico se realiza post síntesis. Una vez formada la partícula se une el fólico en la superficie de la misma formando una capa externa que puede hacer engrosar el tamaño de la misma. La excepción la presenta el nanohidrogel NG-F-83.7.10.7X que presentó el menor tamaño de todos incluido el de su homólogo sin funcionalizar. En las fotografías de SEM y TEM aparecen partículas de morfología esférica de muy pequeño tamaño con la superficie lisa (*Figura 45, 46 y 47*). Las fotografías obtenidas por microscopio electrónico de barrido revelan que las partículas tienen cierto grado de agregación, pero en las fotos por microscopía electrónica de

transmisión, se observan partículas muy pequeñas individualizadas, por lo que este efecto de agregación puede deberse al protocolo de preparación de la muestra para el SEM y no a las partículas ya que requiere un paso previo de recubrimiento con un metal. En todos los casos presentaron un índice de polidispersidad entre 1 y 1,1 (*Tabla 17*) siendo poblaciones de partículas prácticamente homodispersas.



**Figura 81:** Composición y distribución de los monómeros en los nanohidrogeles sin funcionalizar, sintetizados por polimerización radicalaria. — NIPA — 2AAECM — NPAM — NMBA.

La eficiencia de incorporación del fólculo en los sistemas han sido bastante más elevadas (145 - 209  $\mu\text{g}$  de Fólculo/ mg NG, *Tabla 19*) que en el caso de las nanopartículas (los otros sistemas que se han funcionalizados) ( $22,5 \pm 2,5$  -  $2,4 \pm 0,5$   $\mu\text{g}$  de Fólculo/ mg NP, *Tabla 18*). Esto puede deberse a que, en los nanohidrogeles, la incorporación se realizó después de la síntesis de las partículas siendo su incorporación más efectiva mientras que en las nanopartículas se realizó durante la síntesis (comentado anteriormente en la discusión de las NP). Dentro de los nangeles, destaca que, aquellos sistemas con un mayor porcentaje de entrecruzamiento (7% de NMBA), NG-F-80.10.10.7X y NG-F-83.7.10.7X, incorporaron más fólculo (68 – 62%) frente a los sistemas con un 5% de NMBA (51 – 44%) (*Tabla 19*). La cantidad de fólculo unido a los NG debería de depender de la cantidad del monómero 2AAECM puesto que se une al nanogel a través de él. Este monómero fue el único constante (al 10%) que no se varió entre los sistemas sintetizados, sin embargo, esta diferencia puede deberse a una

pequeña encapsulación del fóllico en el interior del sistema, en aquellos NG con un mayor grado de entrecruzamiento. Para la funcionalización, los sistemas se hidrataron en agua donde se añadió en exceso ácido fólico. Debido a la hidrofília del NG y del fóllico, éste último pudo sufrir una atracción hacia el interior del sistema quedando encapsulado debido al mayor grado de entrecruzante

El estudio termogavimétrico demuestra que la reacción de polimerización se ha llevado a cabo correctamente puesto que los perfiles termogavimétricos que presentan los NG son totalmente diferentes a los de los monómeros iniciales, debido al cambio de las características que se produce en el sistema después de la polimerización (*Figura 50*). Todos los monómeros, fármaco y ácido fólico presentaron una estabilidad por encima de los 100°C (*Tabla 22*), por lo que permanecieron estables durante la síntesis de los NG ya que no se llegaron a alcanzar dichas temperaturas. Cabe destacar que el ácido fólico presenta un pico de degradación térmica a 95°C que corresponde solo al 5,7% de la pérdida de masa. Este bajo porcentaje a esta temperatura tan baja cerca de los 100°C es característico de la presencia de agua en la muestra, por ello dicho evento no se atribuye al ácido fólico como tal. Como ya hemos visto en otras partículas (microesferas sintetizadas por atomización y secado) la presencia del fármaco en el sistema incrementa la estabilidad térmica del mismo aumentando la temperatura de los eventos térmicos tanto de las NG sin funcionalizar como de los funcionalizados. En los NG-F (nanogeles funcionalizados) sin TMX se observan tres eventos térmicos mientras que la presencia del fármaco, en estos sistemas, hace que la degradación se produzca en uno solo paso. Esto lleva a pensar que el fármaco puede llegar a interactuar con el sistema. Así mismo, comparando los NG funcionalizados (NG-F) con los no funcionalizados (NG), se observa una bajada en la temperatura de degradación térmica lo que se debe a la presencia del fóllico en la superficie, el cual tiene una temperatura inferior de degradación, confirmando su presencia en la partícula.

La incorporación del fármaco en los nanohidrogeles se llevó a cabo post-síntesis a diferencia de las MS y NP en los cuales se incorporó durante la síntesis de los sistemas. Esta es una forma diferente y no menos efectiva de incorporar el fármaco. Se ha seleccionado este método de incorporación ya que las condiciones de la síntesis no permiten la disolución del fármaco junto con los polímeros en el mismo medio. Los monómeros son hidrofílicos por lo que la fase interna es acuosa, mientras que el TMX es hidrofóbico y quedaría en la fase externa, permaneciendo excluido de la zona de polimerización y por tanto fuera de la



partícula. Además, modulando las características del medio (pH y temperatura), se puede forzar el hinchamiento total del sistema y después colapsar el entramado, para atrapar el fármaco en las partículas después de sus síntesis. La incorporación del fármaco ha sido elevada en todos los casos, gracias a que el fármaco fue soluble en el medio y a la temperatura a la cual los sistemas se hinchaban. Los NG presentaron diversos grados de hinchamiento en medios orgánicos donde el fármaco es altamente soluble seleccionando finalmente el etanol en el cual demostró tener un mayor grado de hinchamiento y es un buen disolvente del TMX. Se aprovechó también la sensibilidad a la temperatura, por lo que la incorporación se llevó a cabo a temperatura ambiente (20 – 25°C) a la cual, los sistemas se encuentran altamente hinchados por la presencia del NIPA. Esto permitió una completa incorporación del fármaco obteniendo eficiencias de incorporación entorno al 100% (*Tabla 25*). Es por tanto una buena técnica para incorporar el fármaco en los nanogeles.

#### **Estudios de liberación del TMX a partir de los nanohidrogeles**

En los ensayos de liberación de estos sistemas se observa que son capaces de controlar la liberación del fármaco en el tiempo y que depende de la composición polimérica así como del grado de entrecruzamiento y la funcionalización (*Figura 53*). Los sistemas que presentaron un menor grado de entrecruzamiento, 5% de NMBA, (NG-80.10.10.5x, NG-83.7.10.5x, NG-F-80.10.10.5x y NG-F-83.7.10.5x) permitieron una liberación mayor (100 - 98%) frente a los que tenían un grado de entrecruzamiento superior (7% de NMBA) (88 – 81%), puesto que el mayor grado de entrecruzamiento dificulta la apertura del sistema y la salida del fármaco (*Tabla 28*). Así mismo el porcentaje en la composición de los monómeros también afecta a la liberación ya que a medida que aumenta la proporción de NIPA y disminuye la del NPAM se ve ralentizada la liberación (*Tabla 31*). El NIPA es el monómero termosensible, que nos permite hinchar el sistema para incorporar el fármaco, pero durante la liberación (a 37°C) hace que parte del sistema esté colapsado, por lo que es el NPAM el responsable del hinchamiento del sistema durante la liberación. De esta forma, en los sistemas NG-83.7.10 5x y NG-83.7.10 7x, tienen menor hinchamiento, un mayor control de la liberación, con velocidades más lentas prolongando la salida del fármaco hasta 3 y 5,2 días respectivamente. La presencia del fólculo en la superficie de la partícula no interviene en el proceso de hinchamiento por lo que no modifica la cantidad liberada de fármaco (100 – 81%) (*Tabla 28*). Sin embargo es una molécula hidrofílica que atrae el agua del medio hacia el sistema favoreciendo la humectación del

sistema, así como la penetración del agua en el interior y por tanto la salida del fármaco. Es por esto que el tiempo de liberación del TMX en los sistemas funcionalizados es de 1,4 a 2,2 días mientras que en los sistemas sin funcionalizar se alarga hasta 5,2 días. En estos sistemas funcionalizados se ve, una vez más, cómo afecta el tamaño a la liberación ya que aquellos sistemas con un menor tamaño (NG-F-83.7.10.7X con 37 nm) (*Tabla 17*) son las que más rápido liberaron (18,8 µg TMX / h en la primera etapa) (*Tabla 31*), dicha velocidad fue disminuyendo a medida que aumentó el tamaño del sistema. Cabe destacar que el sistema que liberó una menor cantidad de fármaco fue el sistema NG-80.10.10.5x sin funcionalizar con fólico pero está relacionado con la cantidad de TMX incorporado ya que es el NG que menos cantidad incorpora.

Al igual que los sistemas anteriores inicialmente la velocidad de liberación (*Tabla 31*) es mayor y a medida que pasa el tiempo se ralentiza la salida del fármaco. De esta forma se diferencian tres etapas de liberación. El sistema que presentó la liberación más lenta fue el NG-83.7.10 7x puesto que es el que presenta una mayor proporción de NIPA y entrecruzante y además no tiene fólico que favorezca la entrada de agua.

### **Aplicación de los modelos matemáticos**

Los hidrogeles por definición son sistemas hinchables y altamente hidrofílicos con gran capacidad de captar agua pero totalmente insolubles debido al entrecruzamiento. Además, los monómeros usados no son biodegradables, por lo que el modelo de Hopfenberg (basado en procesos de degradación) por definición no se puede aplicar en la liberación de estos sistemas, mientras que los modelos de Higuchi y Korsmeyer – Peppas sí que se han podido emplear presentando un buen ajuste a ambos modelos (*Tabla 34*).

Se ha demostrado que hay un proceso de difusión que afecta hasta el 100% del fármaco liberado, presentando una mayor velocidad de difusión los sistemas con un menor grado de entrecruzante (5%) frente a los de 7% de entrecruzamiento (modelo Higuchi *Tabla 34*). Se observa, así mismo, que los sistemas funcionalizados presentaban una mayor constante de difusión que sus homólogos sin funcionalizar, lo que está en concordancia con todos los estudios anteriores (liberación y velocidades de liberación). Además, estos sistemas funcionalizados (NG-F), presentaron dos etapas, con valores de constante de difusión más

elevadas en la primera. El fólico en la superficie hace más hidrofílica a la partícula favoreciendo la atracción del agua y la difusión a través del sistema.

El modelo Korsmeyer – Peppas ha mostrado un buen ajuste con las cinéticas de liberación de los NG hasta prácticamente el 100% del fármaco liberado, obteniendo diferentes valores de  $n$ . Destacan los sistemas que obtuvieron valores de  $n$  próximos a 0,43 (NG-80.10.10.5x; NG-83-7.10.5x; NG-83.7.10.7x y NG-F-80.10.10.7x), en los cuales se puede afirmar que la liberación está determinada por la difusión, siendo las liberaciones más fickianas de todas. Al igual que se ha detectado con el modelo de Higuchi, los sistemas funcionalizados con 7% de entrecruzante (NG-F-80.10.10.7x y NG-F-83.7.10.5x), presentaron dos etapas con un valor de  $n$  mucho menor en la segunda etapa, lo que indica que la velocidad de salida del fármaco se ralentiza con el tiempo.

### **Estudios en cultivos celulares**

Los nanogeles placebo (sin fármaco) (Figuras 58 - 60) pueden considerarse citocompatibles en las tres líneas celulares estudiadas, ya que la viabilidad celular en ningún caso descendió del 80%. Cuando se realizan los ensayos con los nanogeles vectorizados con ácido fólico se aprecia un descenso algo mayor de la viabilidad celular en el primer día de estudio, recuperándose a valores superiores al 80% al sexto día. Probablemente este hecho se relaciona con una mayor internalización de los nanosistemas debido a la presencia del ácido fólico en su superficie. De hecho, la internalización de los nanogeles vectorizados es muy superior a la de sus equivalentes sin vectorizar (Figura 62 y 63), con la excepción de los nanosistemas NG-F-80.10.10.7x y NG-F-83.7.10.7x en las células T47D, donde la presencia de la molécula vectora no mejora la internalización. Por tanto, su mayor presencia en el interior celular sería la causa del descenso que se aprecia en los primeros tiempos del estudio.

La eficacia de los nanogeles-TMX en causar muerte celular es manifiesta en las líneas celulares MCF7 (Figura 59) y T47D (figura 60). En ambos casos, tanto los nanosistemas vectorizados con fólico como los no vectorizados producen un descenso de la viabilidad celular a las dos concentraciones de TMX estudiadas, lo cual se correlaciona con la presencia de receptores estrogénicos en ambos tipos celulares, que hacen a estas células muy sensibles a la acción del TMX. En el caso de los nanogeles vectorizados con fólico su eficacia en MCF7 y T47D es mayor que la del fármaco en disolución, principalmente, en el primer día del estudio. No

sucede lo mismo en los estudios llevados a cabo en la línea celular HeLa (Figura 58), donde los nanogeles-TMX no inducen muerte celular a las concentraciones estudiadas. Este hecho puede deberse a la ausencia de receptores estrogénicos en esta línea celular, que la hace menos sensible al TMX, y a que la liberación del fármaco desde los nanogeles, en ausencia de tensioactivo, es lenta y no proporciona una concentración suficiente para causar muerte celular a través de la cascada de las MAPKinasas, mecanismo por el que actúa el TMX en esta línea celular.

La eficacia de los nanosistemas-TMX también puede entenderse en términos de internalización (Figuras 62, 63, 65, 66). Todos los nanosistemas se internalizan, pero en mayor proporción, en general, aquellos que tienen unido ácido fólico en su superficie. Lo que se correlaciona con el mayor efecto citotóxico de los nanosistemas vectorizados cargados con TMX en las líneas celulares con receptores de estrógenos. En cuanto a la internalización dependiente de receptores de folato, los estudios de inhibición en presencia de ácido fólico libre (Figura 68) ponen de manifiesto que la presencia de receptor de folato es decisiva en la internalización de los nanosistemas vectorizados en las células MCF7, para la mayoría de las formulaciones, y en las células T47D para una formulación concreta. En los demás casos, se aprecia una tendencia a menor internalización cuando hay una inhibición de los receptores, pero no son datos estadísticamente significativos. Habría por tanto, otros mecanismos de internalización que se ven mejorados por la presencia de ácido fólico en la superficie de los nanogeles, y que contribuyen a incrementar su presencia en el citoplasma celular. La composición de los nanosistemas es decisiva y determina sus interacciones con las moléculas de la superficie celular. En este sentido, existen otros estudios de nanogeles no vectorizados basados en NIPA y N-hidroxietil-acrilamida (Perez, Fernandez, Olmo, Teijon, & Blanco, 2014) (Perez, Martinez, Teijon, Teijon, & Blanco, 2014) en los que se observa internalización, tiempo dependiente, por endocitosis en distintas líneas celulares de cáncer humano, de las cuales las células MCF7 y T47D son las que mayor internalización experimentan, mientras que se aprecia una menor entrada en las células HeLa, lo que está en concordancia con los resultados obtenidos en el presente estudio. Por otra parte, estudios de internalización celular con nanopartículas basadas en polímeros biológicos y vectorizadas con ácido fólico (Martinez et al., 2014) ponen también de manifiesto que la composición de los nanosistemas es esencial en los procesos de incorporación al interior celular, y que existen mecanismos inespecíficos que pueden actuar, conjuntamente con la internalización mediada por receptor de folato, en la captación intracelular de los nanosistemas.

**Tabla 37:** Incorporación celular a las 2h de las diferentes nanopartículas sintetizadas por polimerización sin funcionalizar y funcionalizadas en células con receptores de folato inhibidas y sin inhibir por folato en disolución.

Nanogeles	LINEA CELULAR	Sin funcionalizar (2h)	Funcionalizados (2h)	Incorporación celular con inhibición
NG- 80.10.10 5X	T47D	3,96 ± 0,27	27,2 ± 1,11	15,69 ± 2,07
	MCF7	3,75 ± 0,12	12,46 ± 1,95	22,7 ± 1,26
	HELA	3,49 ± 0,05	17,28 ± 1,33	18,97 ± 1,04
NG- 80.10.10 7X	T47D	4,82 ± 0,54	5,58 ± 0,77	6,64 ± 1,78
	MCF7	3,01 ± 0,09	3,01 ± 0,097	10,64 ± 0,56
	HELA	4,37 ± 0,94	4,36 ± 0,94	4,43 ± 0,66
NG- 83.7.10 5X	T47D	2,31 ± 0,24	5,15 ± 0,37	3,19 ± 0,1
	MCF7	4,13 ± 0,7	8,07 ± 1,3	5,04 ± 0,19
	HELA	1,41 ± 0,32	3,6 ± 0,19	2,17 ± 0,24
NG- 83.7.10 7X	T47D	10,68 ± 0,98	10,71 ± 0,32	7,3 ± 0,42
	MCF7	8,44 ± 0,72	12,10 ± 0,28	9,35 ± 0,42
	HELA	5,43 ± 0,31	5,43 ± 0,31	7,14 ± 1,45

Tras los últimos años, se ha observado un gran interés por el estudio de sistemas nanoparticulados debido a las características tan favorables que resentan en muchas de las aplicaciones en el campo de la biomedicina. Como sistemas de liberación controlada de fármacos, estas nuevas formas galénicas proporcionan una mejora terapéutica incrementando su eficacia y disminuyendo sus efectos adversos. Sin embargo, muchos factores pueden afectar a la funcionalidad del sistema y en consecuencia al éxito del tratamiento. Los resultados descritos en este trabajo demuestran que se pueden diseñar diferentes sistemas eficaces para controlar la liberación de un fármaco antitumoral, cuyas características se pueden modular en función de la técnica de síntesis, materiales poliméricos seleccionados, tamaño y forma de los sistemas entre otros.

Los sistemas nanoparticulados ofrecen una oportunidad para incorporar el fármaco en su interior y conseguir a su vez incrementar su selectividad creando una plataforma que se puede simultáneamente vectorizar el fármaco al lugar correcto de acción y liberarlo controladamenre consiguiendo personalizar la terapia (Patra & Turner, 2014). La gran versatilidad de estos transportadores nos permiten dar un paso más en las terapias y no solo conseguir modular la liberación de forma temporal sino también espacial, creando una nueva generación de fármacos inteligentes a través de la funcionalización y vectoriación.

## **CONCLUSIONES**



- El proceso de atomización y secado, utilizado como técnica para encapsulación de tamoxifeno en sistemas poliméricos basados en poliésteres alifáticos, permite obtener micropartículas con un tamaño medio de 1,5  $\mu\text{m}$ , y un porcentaje significativo en el intervalo nanométrico, con elevadas eficiencias de incorporación del fármaco (entre 36 y 49  $\mu\text{g}$  TMX/mg NP). Estos sistemas son capaces de modular la liberación de tamoxifeno entre 11 y 58 días en función de su composición, y resultan terapéuticamente eficaces en la línea celular MCF7 de cáncer de mama humano. Los estudios *in vivo* ponen de manifiesto la biocompatibilidad de los estos sistemas poliméricos, que protegen al fármaco de su degradación, permitiendo la presencia de tamoxifeno en plasma durante un prolongado periodo de tiempo, incrementándose doce veces su tiempo medio de residencia.
- La síntesis de nanopartículas basadas en mezclas de poliésteres alifáticos mediante la técnica de emulsión/evaporación resulta en sistemas con un tamaño medio entre 72 y 147 nm, manteniendo elevadas eficiencias de incorporación de tamoxifeno (entre 95 y 110  $\mu\text{g}$  TMX/mg NP), y permitiendo el control de la liberación del fármaco durante un periodo máximo de 3,3 días. El descenso de la viabilidad celular causada por estos nanosistemas con tamoxifeno en líneas celulares humanas de cáncer de mama (MCF7 y T47D) y de cérvix (HeLa) pone de manifiesto su eficacia.
- La funcionalización de las nanopartículas de poliésteres con ácido fólico, mediada por la unión de polietilenglicol (PEG), genera sistemas con características específicas, consecuencia de la modificación hidrofílica de la superficie de estos sistemas hidrofóbicos, que afectan tanto a la liberación del tamoxifeno, que se produce a mayor velocidad, como a su interacción con la superficie celular. La presencia de ácido fólico en la superficie de las nanopartículas incrementa, en la mayoría de los casos, su internalización celular, aunque se ve influida por la composición de la nanopartícula y por la línea celular. La internalización mediada específicamente por el receptor de folato se produce en las tres líneas celulares para las nanopartículas de



composición LG50:LG75 (50%). Las nanopartículas funcionalizadas cargadas con tamoxifeno son más eficaces que el fármaco no encapsulado, causando descenso de la viabilidad celular en todos los tipos celulares estudiados.

- La síntesis del monómero ionizable N-piridin acrilamida (NPAM), y del monómero 2-acril amido etil carbamato (2AAECM) ha permitido sintetizar nanohidrogeles copoliméricos de tipo catiónico, mediante polimerización radicalaria en microemulsión, que son sensibles a cambios de pH del medio, y a cambios de temperatura por la presencia de N-isopropilacrilamida. La vectorización de los nanogeles con ácido fólico se produce por la presencia del monómero 2AAECM. Los hidrogeles sintetizados tienen tamaño nanométrico (entre 37 y 268 nm), incorporan tamoxifeno (entre 39 y 50  $\mu\text{g}$  TMX/mg NG) y lo liberan de forma controlada entre 1,3 y 5,2 días *in vitro* en presencia de tensioactivo en el medio.
- Los nanogeles son citocompatibles en las líneas celulares estudiadas, aunque la presencia de ácido fólico en su superficie causa un descenso de la viabilidad celular en el primer día de estudio, que puede atribuirse a la mayor internalización celular que se observa por la presencia de folato. Sin embargo, internalización específica mediada por receptores de folato sólo es claramente atribuible en la línea celular MCF7 para la mayoría de los nanosistemas, y en la línea T47D para una composición específica de nanogel (composición 80.10.10.5x). Los nanogeles cargados con tamoxifeno son eficaces en las líneas celulares con receptores de estrógenos (MCF7 y T47D), donde el fármaco ejerce su acción de forma muy específica.

## **ANEXOS**



## ANEXO I

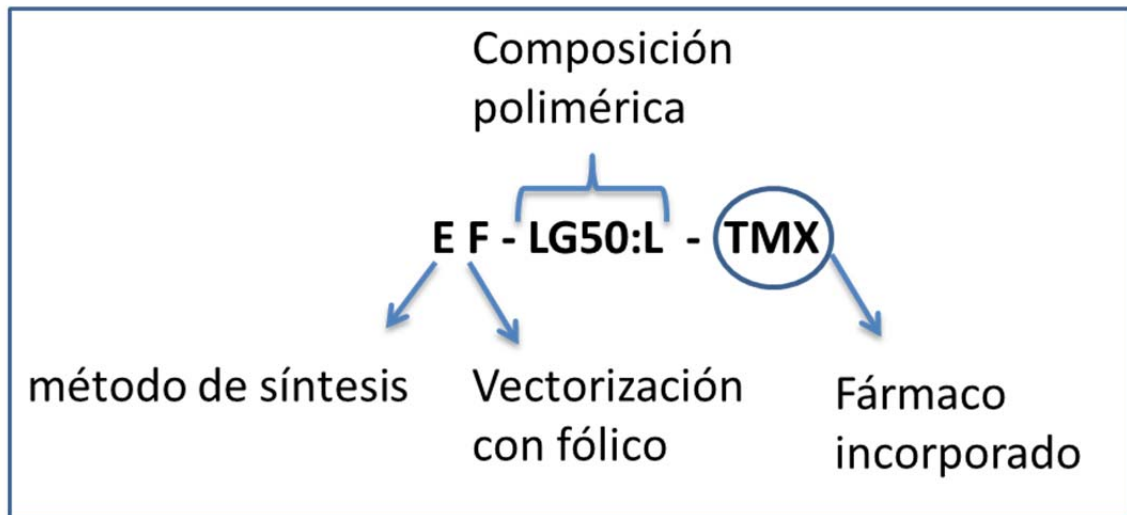
### Nomenclatura de los sistemas

MÉTODO DE SÍNTESIS	VECTORIZACIÓN CON FÓLICO	COMPOSICIÓN POLIMÉRICA	NOMENCLATURA POLIMÉRICA	PRESENCIA DE FÁRMACO (TMX)	NOMENCLATURA DE LAS PARTÍCULAS
SPRAY DRYING					
S		PLGA 75/25	LG75		S-LG75
S		PLGA 75/25	LG75	TMX	S-LG75-TMX
S		PLGA 50/50	LG50		S-LG50
S		PLGA 50/50	LG50	TMX	S-LG50- TMX
S		PLGA 50/50 (50%) + PLGA 75/25 (50%)	LG50:LG75		S-LG50:LG75
S		PLGA 50/50 (50%) + PLGA 75/25 (50%)	LG50:LG75	TMX	S-LG50:LG75- TMX
S		PLA (25%)+ PLGA 50/50 (75%)	LG50:L		S-LG50:L
S		PLA (25%)+ PLGA 50/50 (75%)	LG50:L	TMX	S-LG50:L- TMX
S		PLA (25%)+ PLGA 75/25 (75%)	LG75:L		S-LG75:L- TMX
S		PLA (25%)+ PLGA 75/25 (75%)	LG75:L	TMX	S-LG75:L- TMX

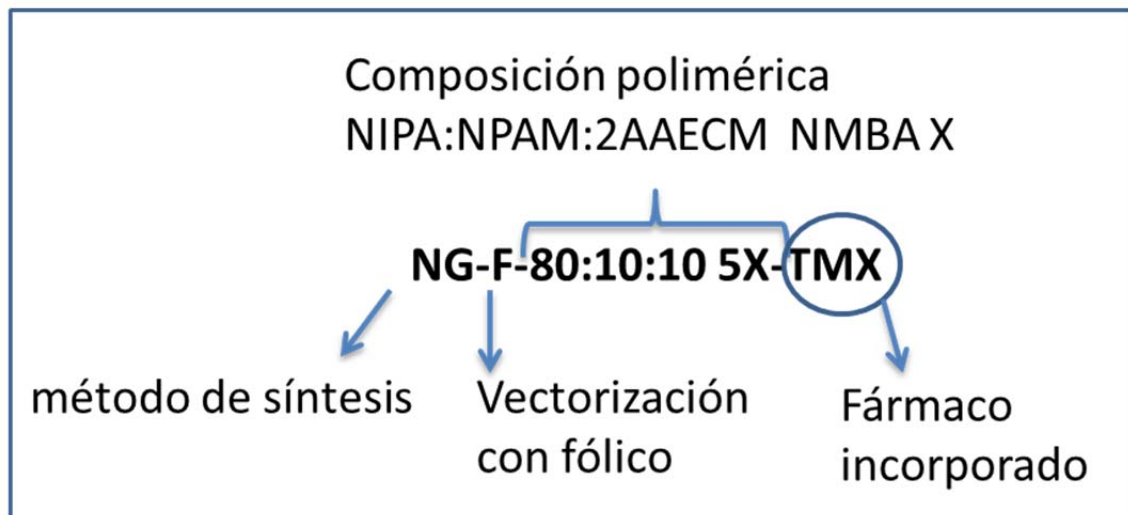
MÉTODO DE SÍNTESIS	VECTORIZACIÓN CON FÓLICO	COMPOSICIÓN POLIMÉRICA	NOMENCLATURA POLIMÉRICA	PRESENCIA DE FÁRMACO (TMX)	NOMENCLATURA DE LAS PARTÍCULAS
EMULSIÓN					
E		PLGA 50/50	LG50		E-LG50
E		PLGA 50/50	LG50	TMX	E-LG50-TMX
E	F	PLGA 50/50	LG50		EF-LG50
E	F	PLGA 50/50	LG50	TMX	EF-LG50- TMX
E		PLGA 50/50 (50%) + PLGA 75/25 (50%)	LG50:LG75		E-LG50:LG75
E		PLGA 50/50 (50%) + PLGA 75/25 (50%)	LG50:LG75	TMX	E-LG50:LG75- TMX
E	F	PLGA 50/50 (50%) + PLGA 75/25 (50%)	LG50:LG75		EF-LG50:LG75
E	F	PLGA 50/50 (50%) + PLGA 75/25 (50%)	LG50:LG75	TMX	EF-LG50:LG75- TMX
E		PLA (25%)+ PLGA 75/25 (75%)	LG75:L		E-LG75:L
E		PLA (25%)+ PLGA 75/25 (75%)	LG75:L	TMX	E-LG75:L- TMX
E	F	PLA (25%)+ PLGA 50/50 (75%)	LG50:L		EF-LG50:L
E	F	PLA (25%)+ PLGA 50/50 (75%)	LG50:L	TMX	EF-LG50:L- TMX

MÉTODO DE SÍNTESIS	VECTORIZACIÓN CON FÓLICO	COMPOSICIÓN POLIMERICA	NOMENCLATURA POLIMÉRICA	PRESENCIA DE FÁRMACO (TMX)	NOMENCLATURA DE LAS PARTÍCULAS
POLIMERIZACIÓN (NG)					
NG		NIPA 80%:NPAM 10%:2AAECM 10% -NMBA 5%	80:10:10 5X		NG-80:10:10 5X
NG		NIPA 80%:NPAM 10%:2AAECM 10% -NMBA 5%	80:10:10 5X	TMX	NG-80:10:10 5X-TMX
NG	F	NIPA 80%:NPAM 10%:2AAECM 10% -NMBA 5%	80:10:10 5X		NG-F-80:10:10 5X
NG	F	NIPA 80%:NPAM 10%:2AAECM 10% -NMBA 5%	80:10:10 5X	TMX	NG-F-80:10:10 5X-TMX
NG		NIPA 80%:NPAM 10%:2AAECM 10% -NMBA 7%	80:10:10 7X		NG-80:10:10 7X
NG		NIPA 80%:NPAM 10%:2AAECM 10% -NMBA 7%	80:10:10 7X	TMX	NG-80:10:10 7X-TMX
NG	F	NIPA 80%:NPAM 10%:2AAECM 10% -NMBA 7%	80:10:10 7X		NG-F-80:10:10 7X
NG	F	NIPA 80%:NPAM 10%:2AAECM 10% -NMBA 7%	80:10:10 7X	TMX	NG-F-80:10:10 7X-TMX
NG		NIPA 83%:NPAM 7%:2AAECM 10% -NMBA 5%	83:7:10 5X		NG-83:7:10 5X
NG		NIPA 83%:NPAM 7%:2AAECM 10% -NMBA 5%	83:7:10 5X	TMX	NG-83:7:10 5X-TMX
NG	F	NIPA 83%:NPAM 7%:2AAECM 10% -NMBA 5%	83:7:10 5X		NG-F-83:7:10 5X
NG	F	NIPA 83%:NPAM 7%:2AAECM 10% -NMBA 5%	83:7:10 5X	TMX	NG-F-83:7:10 5X-TMX
NG		NIPA 83%:NPAM 7%:2AAECM 10% -NMBA 7%	83:7:10 7X		NG-83:7:10 7X
NG		NIPA 83%:NPAM 7%:2AAECM 10% -NMBA 7%	83:7:10 7X	TMX	NG-83:7:10 7X-TMX
NG	F	NIPA 83%:NPAM 7%:2AAECM 10% -NMBA 7%	83:7:10 7X		NG-F-83:7:10 7X
NG	F	NIPA 83%:NPAM 7%:2AAECM 10% -NMBA 7%	83:7:10 7X	TMX	NG-F-83:7:10 7X-TMX

## NOMENCLATURA PARTÍCULAS



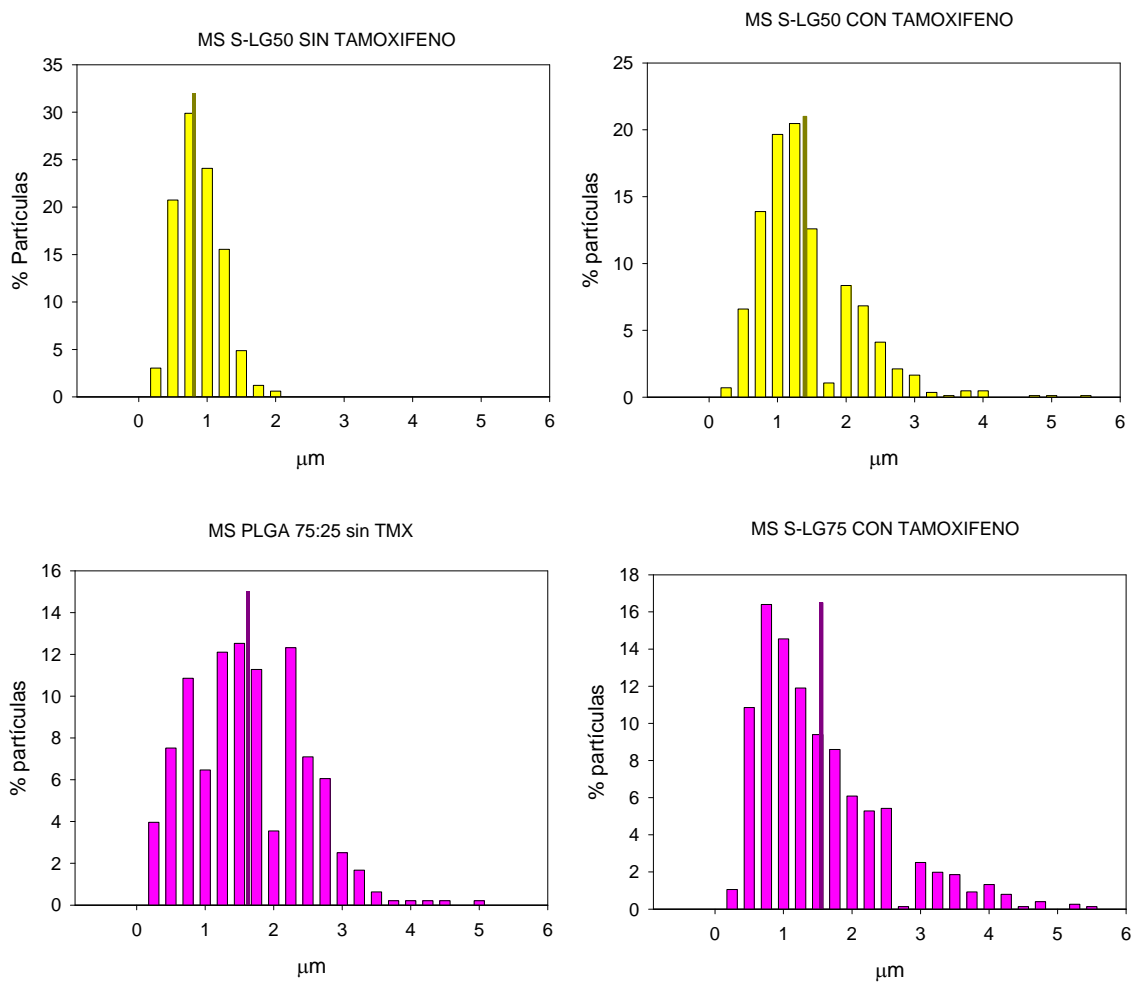
## NOMENCLATURA NANOHIIDROGELES



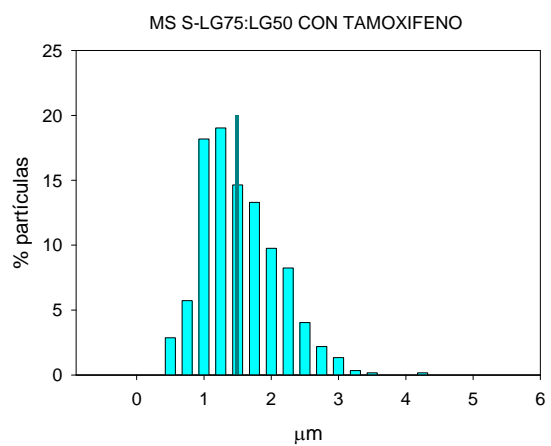
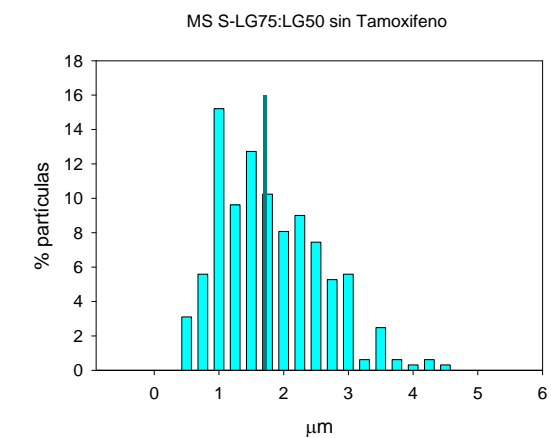
## ANEXO II

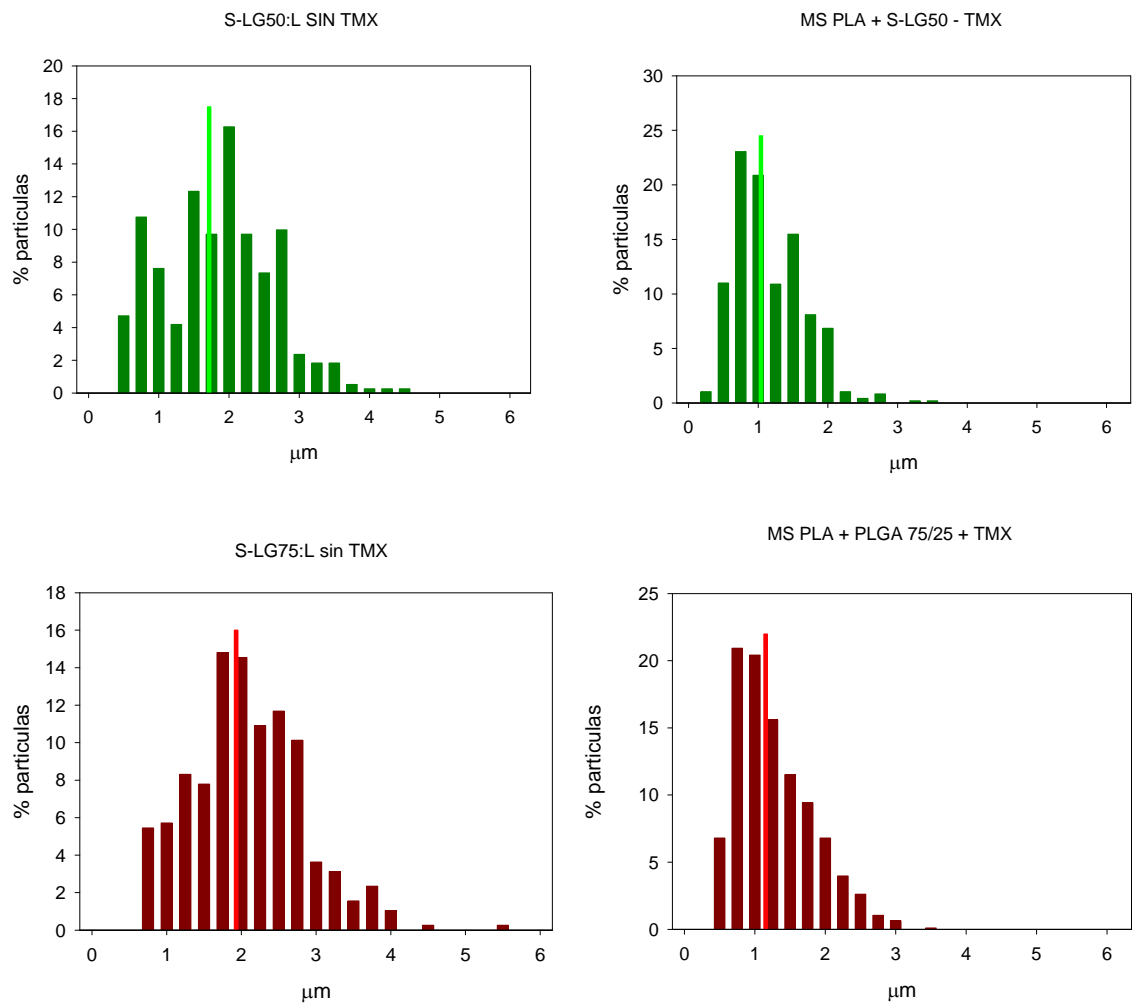
### Distribución de tamaños

#### A) Micropartículas sintetizadas por atomización y secado

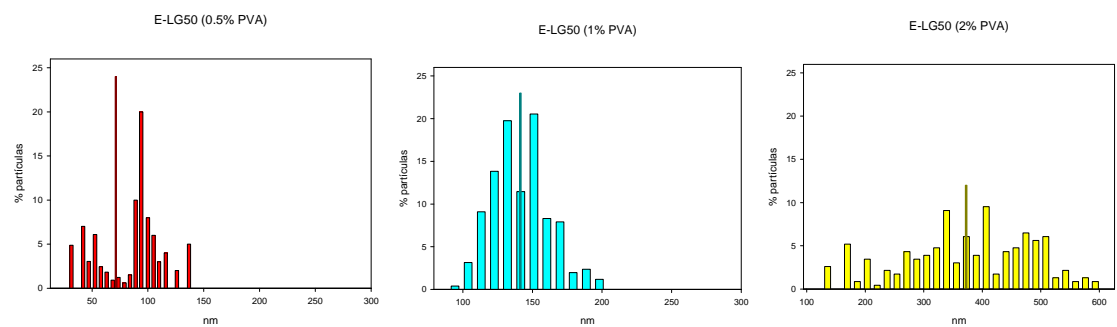


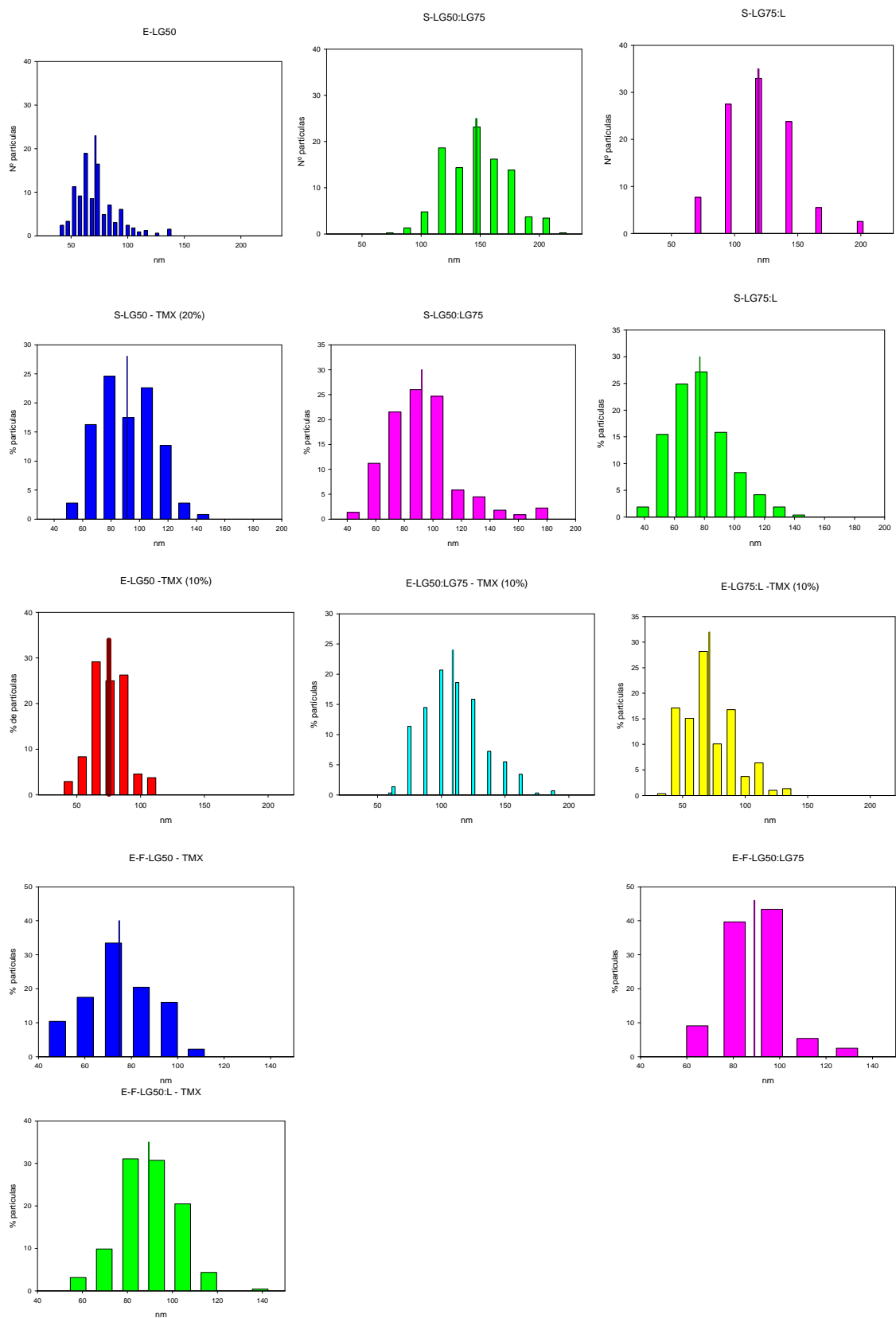




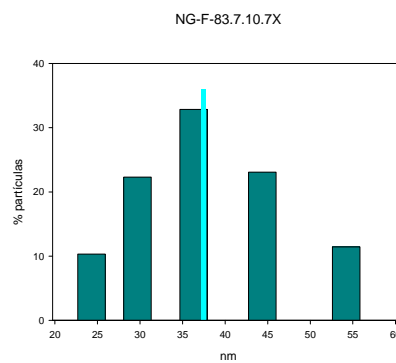
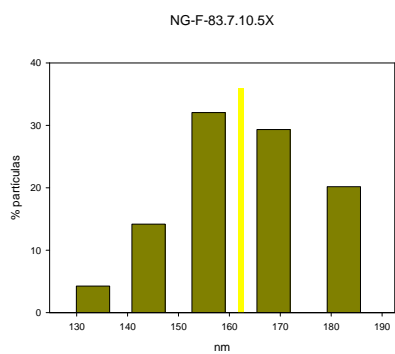
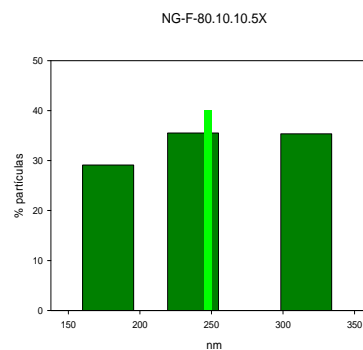
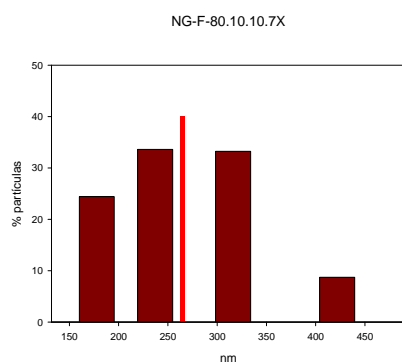
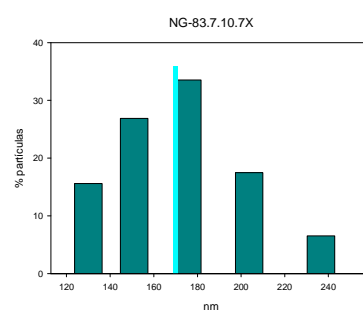
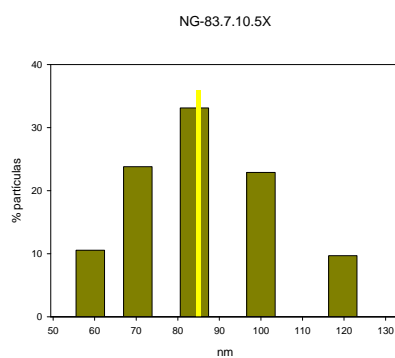
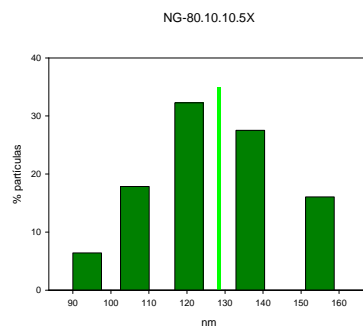
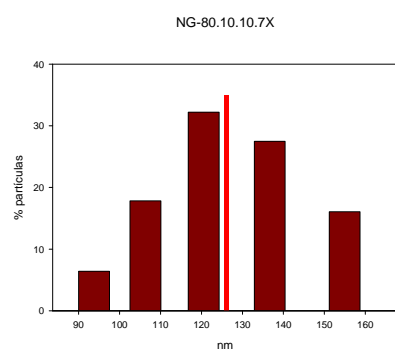


## B) Nanopartículas sintetizadas por emulsión / evaporación





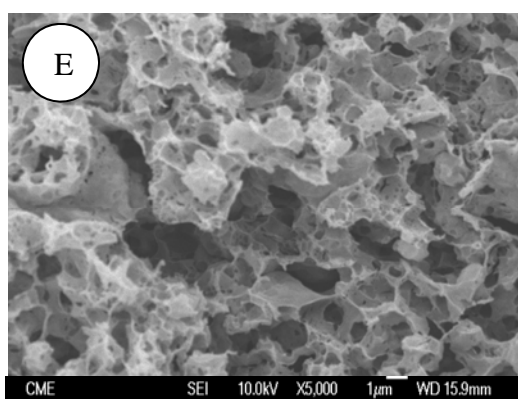
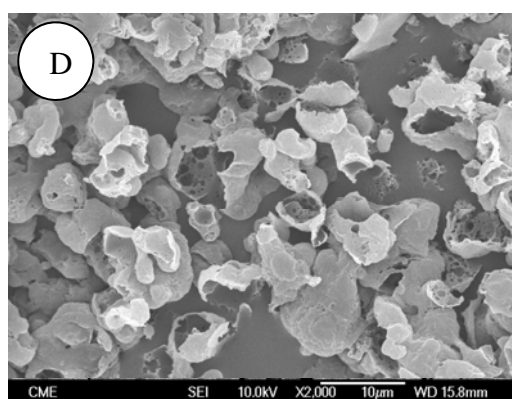
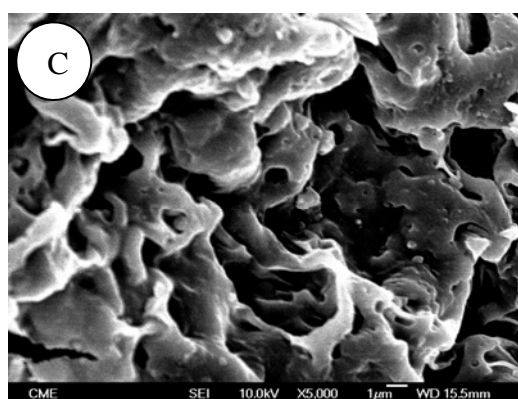
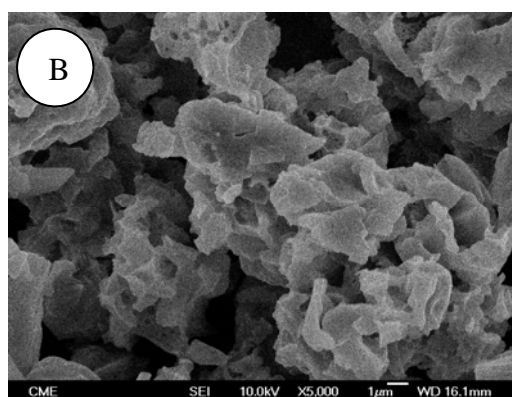
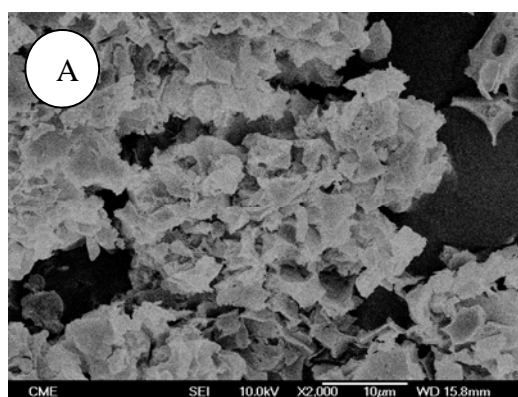
### c) Nanohidrogeles sintetizados por polimerización radicalaria



### ANEXO III

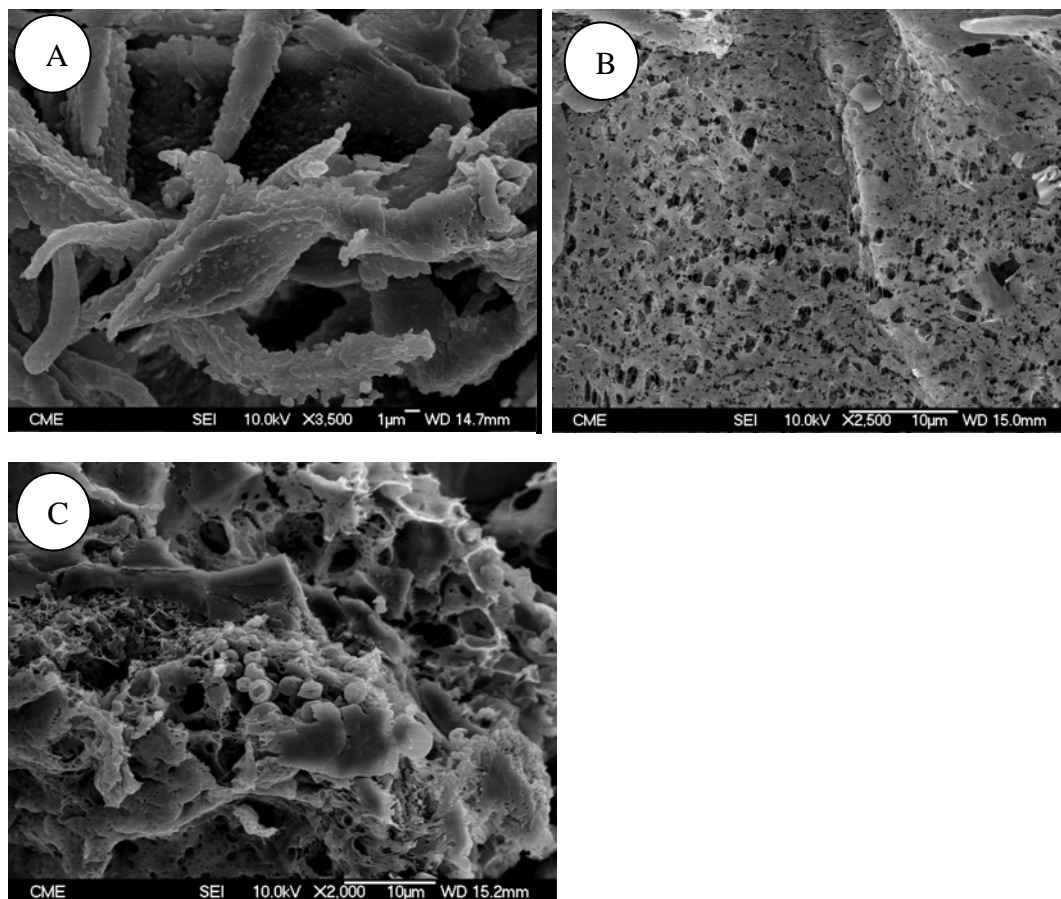
#### Fotografías de los restos de sistemas después de la liberación *in vitro*

##### A) Micropartículas sintetizadas por atomización y secado



A) S-LG75; B) S-LGA50; C) S-LG50:LG75; D) S-LG75:L; E) S-LG50:L.

**A)** Nanopartículas sintetizadas por emulsión / evaporación



*A) E-LG75:L; B) E-LGA50:LG75; C) E-LG50.*

## ANEXO IV

### Parámetros Bioquímicos

	Sistema administrado	Valores al final del experimento
LDH (U/L)	S-LG75:L	157,8 ± 17,5
	S-LG50:LG75	325,1 ± 25,6
	S-LG50	340 ± 43,2
	S-LG75:L + TMX	217,6 ± 21
	S-LG50:LG75 + TMX	256,3 ± 59,3
	S-LG50 + TMX	304,9 ± 40,5
	TMX SOLUTION	375 ± 21,5
	CONTROL	297,9 ± 66,7
CRT (mg/dL)	S-LG75:L	0,764 ± 0,28
	S-LG50:LG75	1,02 ± 0,18
	S-LG50	0,866 ± 0,1
	S-LG75:L + TMX	1,11 ± 0,07
	S-LG50:LG75 + TMX	0,958 ± 0,1
	S-LG50 + TMX	0,665 ± 0,04
	TMX disolución	0,89 ± 0,05
	CONTROL	0,86 ± 0,19
AST (U/L)	S-LG75:L	87,2 ± 8,3
	S-LG50:LG75	93,3 ± 15,5
	S-LG50	92,2 ± 2,22
	S-LG75:L + TMX	67,77 ± 3,7
	S-LG50:LG75 + TMX	70,7 ± 4,9
	S-LG50 + TMX	75,8 ± 4,1
	TMX disolución	63,88 ± 3,6
	CONTROL	73,53 ± 7,6
ALT (U/L)	S-LG75:L	26,25 ± 9,6
	S-LG50:LG75	16,4 ± 5,3
	S-LG50	13,33 ± 0,22
	S-LG75:L + TMX	15,18 ± 4,2
	S-LG50:LG75 + TMX	23,8 ± 1,11
	S-LG50 + TMX	25,5 ± 3,3
	TMX disolución	12,08 ± 5,6
	CONTROL	17,2 ± 3,3

LDH: Lactato deshidrogenasa

CRT: Creatinina

ALT: Alanina aminotransferasa

AST: Aspartato aminotransferasa

## ANEXO V

### **Concentración de partículas administradas en los estudios celulares.**

A continuación se especifica las concentraciones de partículas equivalentes a la dosis de fármaco analizadas (6 y 10  $\mu\text{M}$ ) en los estudios celulares, teniendo en cuenta la cantidad de fármaco incorporado en cada uno de los sistemas.

SISTEMAS	Cantidad de TMX incorporado ( $\mu\text{g}$ TMX / mg partícula)	$\mu\text{g}$ partícula/ml que corresponden a 6 $\mu\text{M}$ de TMX	$\mu\text{g}$ partícula/ml que corresponden a 10 $\mu\text{M}$ de TMX
<b>EMULSIONES</b>			
E- LG50	95,2	23,4	39
E- LG50:LG75	109,6	20,3	33,9
E- LG75:L	97,5	22,8	38,1
EF- LG50	105,3	21,1	35,3
EF-LG50:LG75	91,9	24,2	40,4
EF- LG50:L	131,5	16,9	28,2
<b>NANOGELES</b>			
NG-80.10.10.5x	39,5	56,4	94
NG-80.10.10.7x	49,4	45,1	75,2
NG-83.7.10.5x	50,3	44,3	73,8
NG-83.7.10.7x	47,3	47,1	78,5
NG-F-80.10.10.5x	50,4	44,2	73,7
NG-F-80.10.10.7x	50,2	44,4	74
NG-F-83.7.10.5x	50,2	44,4	74
NG-F-83.7.10.7x	50,3	44,3	73,8



## Artículos publicados

# Tamoxifen-Loaded Microspheres Based on Mixtures of Poly(D,L-lactide-co-glycolide) and Poly(D,L-lactide) Polymers: Effect of Polymeric Composition on Drug Release and *In Vitro* Antitumoral Activity

A. Fernández,<sup>1</sup> C. Tejjón,<sup>2</sup> M. Benito,<sup>1</sup> I. Iglesias,<sup>3</sup> R. Lozano,<sup>4</sup> J. M. Tejjón,<sup>1</sup> M. D. Blanco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Polymeric Materials Group for the Controlled Release of Bioactive Compounds in Biomedicina, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Spain

<sup>2</sup>Polymeric Materials Group for the Controlled Release of Bioactive Compounds in Biomedicina, Departamento de Enfermería, Escuela Universitaria de Enfermería, Fisioterapia y Podología, Universidad Complutense de Madrid, Spain

<sup>3</sup>Polymeric Materials Group for the Controlled Release of Bioactive Compounds in Biomedicina, Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Spain

<sup>4</sup>Polymeric Materials Group for the Controlled Release of Bioactive Compounds in Biomedicina, Departamento de Química inorgánica y Bioinorgánica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Spain

Received 10 February 2011; accepted 23 July 2011

DOI 10.1002/app.35327

Published online 3 November 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

**ABSTRACT:** Mixtures of different bioresorbable polyesters were used to prepare microparticulated tamoxifen delivery systems to achieve anticancer effects in breast malignant cancer cells. Tamoxifen (TMX) was included into microspheres (MS) formulated via spray-drying. Mixtures of poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) of different lactide/glycolide proportions (50 : 50 and 75 : 25) and poly(D,L-lactide) (PLA) were used. The average diameter of the resultant TMX-loaded microparticles was in the range  $1.04 \pm 0.51$ – $1.55 \pm 0.95$   $\mu\text{m}$ . The encapsulation efficiency of TMX was between 97.8% [ $48.9 \pm 0.1$  TMX ( $\mu\text{g}$ )/MS (mg)] and 69.6% [ $36.6 \pm 0.1$  TMX ( $\mu\text{g}$ )/MS (mg)] depending on

the polymeric composition of the formulation. Drug burst effect was not observed. TMX was released from the polymeric matrices in a sustained release manner between 11 and 58 days depending on polymeric composition of microspheres. TMX-loaded microspheres showed high efficacy in causing cell death in MCF7 breast malignant cancer cells. Thus, these TMX-loaded PLGA-based microspheres hold potential to treat breast malignant cancer cells. © 2011 Wiley Periodicals, Inc. *J Appl Polym Sci* 124: 2987–2998, 2012

**Key words:** tamoxifen; drug delivery; polyesters; microspheres; breast cancer

## INTRODUCTION

Chemotherapy causes notoriously undesirable side-effects in many patients, and some of them may die because of the side-effect of the anticancer drugs rather than the cancer itself. Due to these harmful effects, clinical application of some anticancer drugs is limited. In this way, drug delivery systems aiming to overcome side effects.<sup>1</sup> Among biodegradable polymers, poly(D,L-lactic acid), poly(D,L-lactide-co-glycolic acid), and poly( $\epsilon$ -caprolactone) have been extensively used to form microparticles and nanoparticles to encapsulate a variety of therapeutic compounds.<sup>2</sup> The low toxicity of these polyesters and their degradation products<sup>3,4</sup> make possible to obtain biodegradable drug delivery systems, whose proper-

ties can be modified as a function of the polymer molecular weight and copolymerization composition of the polymeric matrices used for drug encapsulation.<sup>5</sup> Furthermore, the methodology chosen to the preparation of polyester microspheres, as well as slight changes of the different parameters of the selected methodology, can have radical effects on microsphere characteristics and, in turn, drug release.<sup>5,6</sup>

The treatment of choice for patients with estrogen receptor (ER) positive breast cancer is tamoxifen (TMX).<sup>7,8</sup> This anticancer drug is mainly employed for long-term prophylactic therapy in high risk and postmenopausal women<sup>9,10</sup> by oral administration. Among side effects of TMX, endometrial cancer, due to agonist activity of the drug in the uterus, and drug resistance, which may lead to further progression of the tumor, are the major ones.<sup>11</sup> These undesirable effects can be minimized by maximized drug concentration in the target tissues and maintained it at minimal level in blood stream and nonspecific organs, which could be achieved by TMX administration by drug delivery systems.

Correspondence to: M. D. Blanco (mdblanco@med.ucm.es).

Contract grant sponsor: Fundación Mutua Madrileña; contract grant number: Grupo UCM-CAM 920613.

Contract grant sponsor: Fundación Rodríguez Pascual.

*Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 124, 2987–2998 (2012)  
© 2011 Wiley Periodicals, Inc.



# In-vivo evaluation of tamoxifen-loaded microspheres based on mixtures of poly (D,L-lactide-co-glycolide) and poly (D,L-lactide) polymers

Ana M. Fernández-Olleros<sup>a</sup>, Rosa Olmo<sup>a</sup>, Enriqueta Muñiz<sup>b</sup>, Rafael Lozano<sup>c</sup>, José M. Teijón<sup>a</sup> and M. Dolores Blanco<sup>a</sup>

Microspheres of different proportions of poly-(D,L-lactide-co-glycolide) and poly-(D,L-lactide) were formulated by spray drying as a drug-delivery system for the treatment of breast cancer with tamoxifen. These systems had been evaluated previously *in vitro* and showed very positive results that have led to further assessment *in vivo*. This work evaluates the performance of these systems in an organism by carrying out a study in female Wistar rats. Microspheres were subcutaneously injected into the back of rats for the assessment of not only the biocompatibility but also the release of the drug contained and its biodistribution. As, *in vitro*, these systems could release the drug under physiological conditions; different plasma concentrations of tamoxifen and one of its metabolites, 4-hydroxy-tamoxifen, were achieved depending on the polymer composition. Microspheres could reduce the accumulation of the drug in different nontarget organs

and presented good biocompatibility. *Anti-Cancer Drugs* 00:000–000 © 2014 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

*Anti-Cancer Drugs* 2014, 00:000–000

**Keywords:** drug-delivery systems, *in-vivo* studies, poly-(lactide-co-glycolide), spray dryer, tamoxifen

<sup>a</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology III, School of Medicine, <sup>b</sup>Department of Cell Biology, School of Biology and <sup>c</sup>Department of Inorganic and Bioinorganic Chemistry, School of Pharmacy, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

Correspondence to: M. Dolores Blanco, PhD, Department of Biochemistry and Molecular Biology III, School of Medicine, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain  
Tel: +34 913 941 447; fax: +34 913 941 601; e-mail: mdblanco@med.ucm.es

The authors are members of the Polymeric Materials Group for the Controlled Release of Bioactive Compounds in Biomedicine.

Received 29 July 2013 Revised form accepted 2 January 2014

## Introduction

Tamoxifen (TMX) is a nonsteroidal antiestrogen and has been the drug of choice for the treatment of hormone-dependent breast cancer for years. It has some beneficial effects, such as its effects on bone density, the cardiovascular system and lipid profile [1,2], but it may cause hyperproliferation of the endometrium, increasing the risk of endometrial cancer and thromboembolic disease [3,4]. Resistance to this drug has developed because of TMX and its metabolites, including 4-hydroxy-tamoxifen (4OH-TMX), which are recognized as substrates by the efflux of P-glycoprotein, breast cancer resistance protein and multidrug resistance-associated protein [5–7]. When it is administered orally, it presents low specificity for tumour cells and because of its high hydrophobicity and the first-pass metabolism, it has low oral bioavailability [8].

In recent years, considerable research has been focused on the controlled-release systems of drugs that enhance the therapeutic efficacy of certain treatments. The development of drug-delivery systems that can modify the biodistribution, tissue uptake and pharmacokinetics of therapeutic agents is considered of great importance in

biomedical research and the pharmaceutical industry [9]. Polymers have been used widely for the synthesis of different systems, such as liposomes–polyethylene glycol, liquid-core nanocapsules, dendrimers, polymer–drug conjugates, nanoparticles, polymeric micelles and polymeric nanogels [10], providing a wide chemistry and morphology variability. They can control the release of the drug under specific conditions, thus increasing the drug specificity and its effectiveness, and decreasing the side effects.

In this work, TMX was included in poly-(lactide-co-glycolide) (PLGA) microspheres (MS) to increase the efficiency of TMX and decrease its side effects. In previous studies, these systems have been successfully synthesized and evaluated *in vitro* [11]. Therefore, this work focuses on their study *in vivo*, assessing pharmacokinetic parameters, biodistribution and biocompatibility in female Wistar rats. *In-vivo* studies have acquired significance as there are some aspects that cannot be evaluated using *in-vitro* studies. It is necessary to assess the behaviour of TMX-loaded MS when they are implanted in animals to measure how the physiological substances influence the drug release. Often, the presence of a foreign element produces cellular and tissue reactions as a defence mechanism. It is therefore necessary to carry out a study that allows the assessment of the reaction of organisms in the presence of MS.

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's website ([www.anti-cancer-drugs.com](http://www.anti-cancer-drugs.com)).

0959-4003 © 2014 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins

DOI: 10.1097/CAD.0000000000000087

## **BIBLIOGRAFÍA**



- AEMPS. (04/2013). Ficha técnica del tamoxifeno. Retrieved from [http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/63754/FT\\_63754.pdf](http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/63754/FT_63754.pdf)
- Ahsan, F., Rivas, I., Khan, M., & Suarez, A. (2002). Targeting to macrophages: Role of physicochemical properties of particulate carriers-liposomes and microspheres-on the phagocytosis by macrophages. *Journal of Controlled Release*, 79(1-3), 29-40. doi:10.1016/S0168-3659(01)00549-1
- Allen, T., & Cullis, P. (2004). Drug delivery systems: Entering the mainstream. *Science*, 303(5665), 1818-1822. doi:10.1126/science.1095833
- Ambike, A., Mahadik, K., & Paradkar, A. (2004). Stability study of amorphous valdecoxib. *International Journal of Pharmaceutics*, 282(1-2), 151-162. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.06.009
- Ameller, T., Legrand, P., Marsaud, V., & Renoir, J. (2004). Drug delivery systems for oestrogenic hormones and antagonists: The need for selective targeting in estradiol-dependent cancers. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 92(1-2), 1-18. doi:10.1016/j.jsbmb.2004.05.006
- American Cancer society. (01/05/2015). Medicamentos para reducir el riesgo de cancer de seno : Aromatase inhibitors. Retrieved from <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeseno/recursosadicionales/fragmentado/medicamentos-para-reducir-el-riesgo-de-cancer-de-seno-aromatase-inhibitors>
- American Cancer society. (2002). Cancer prevention & early delection, facts and figures.
- Anderson, J., Rodriguez, A., & Chang, D. (2008). Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in Immunology*, 20(2), 86-100. doi:10.1016/j.smim.2007.11.004
- Arifin, D., Lee, L., & Wang, C. (2006). Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(12-13), 1274-1325. doi:10.1016/j.addr.2006.09.007
- Arpagaus, D., & Schafroth, D. (2007). *Spray dried biodegradable polymers as target material for controlled drug delivery controlled drug release from spray dried polylactide-co-glycolide particles*. Suiza: Büchi Labortechnik AG.
- Ashwanikumar, N., Kumar, N., Nair, S., & Kumar, G. (2012). Methacrylic-based nanogels for the pH-sensitive delivery of 5-fluorouracil in the colon. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 5769-5779. doi:10.2147/IJN.S31201

- Augurt, T., & Rosenshaft, M. (1977). In Perciaccante V. A. U. S. (Ed.), (4033038th ed.)
- Auras, R., Lim, L., Selke, S., & Tsuji, H. (2010). In Auras R., Lim L., Selke S. and Tsuji H. (Eds.), *Poly(lactic acid): Synthesis, structures, properties, processing, and applications*. New Jersey: John Wiley & Sons.inc.s.
- Babu, A., Templeton, A., Munshi, A., & Ramesh, R. (2014). Nanodrug delivery systems: A promising technology for detection, diagnosis, and treatment of cancer. *Aaps Pharmscitech*, 15(3), 709-721. doi:10.1208/s12249-014-0089-8
- Bae, Y., Okano, T., & Kim, S. (1991). On-off thermocontrol of solute transport .2. solute release from thermosensitive hydrogels. *Pharmaceutical Research*, 8(5), 624-628. doi:10.1023/A:1015860824953
- Basal, E., Eghbali-Fatourehchi, G., Kalli, K., Hartmann, L., Goodman, K., Goode, E., . . . Knutson, K. (2009). Functional folate receptor alpha is elevated in the blood of ovarian cancer patients. *Plos One*, 4(7), e6292. doi:10.1371/journal.pone.0006292
- Bazak, R., Hourri, M., El AS, Kamel, S., & Refaat, T. (2015). Cancer active targeting by nanoparticles: A comprehensive review of literature. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 141(5), 769-784. doi:10.1007/s00432-014-1767-3
- Berkland, C., Kim, K. K., & Pack, D. W. (2004). Protein Release from uniform poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *31st International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials*, , 472.
- Berkland, C., King, M., Cox, A., Kim, K., & Pack, D. (2002). Precise control of PLG microsphere size provides enhanced control of drug release rate. *Journal of Controlled Release*, 82(1), 137-147. doi:10.1016/S0168-3659(02)00136-0
- Bezemer, J., Radersma, R., Grijpma, D., Dijkstra, P., van Blitterswijk, C., & Feijen, J. (2000). Microspheres for protein delivery prepared from amphiphilic multiblock copolymers 2. modulation of release rate. *Journal of Controlled Release*, 67(2-3), 249-260. doi:10.1016/S0168-3659(00)00212-1
- Bittner, B., Ronneberger, B., Zange, R., Volland, C., Anderson, J., & Kissel, T. (1998). Bovine serum albumin loaded poly(lactide-co-glycolide) microspheres: The influence of polymer purity on particle characteristics. *Journal of Microencapsulation*, 15(4), 495-514. doi:10.3109/02652049809006876
- Blanco, M. D., Olmo, R., & Teijon, J. M. (2007). Hydrogels. In J. Swarbrick (Ed.), *Encyclopedia of pharmaceutical technology* (third ed., pp. 2021-2039). New York: Informa Healthcare.
- Blanco, M., Olmo, R., & Teijón, J. (2012). Targeted nanoparticles for cancer therapy. In A. D. Sezer (Ed.), *Recent advances in novel drug carrier systems* (pp. 241-278) InTech.

- Blanco, M., Guerrero, S., Benito, M., Teijon, C., Olmo, R., Muniz, E., . . . Teijon, J. (2010). Tamoxifen-loaded folate-conjugate poly[(p-nitrophenyl acrylate)-co-(N-isopropylacrylamide)] sub-microgel as antitumoral drug delivery system. *Journal of Biomedical Materials Research Part a*, 95A(4), 1028-1040. doi:10.1002/jbm.a.32929
- Blanco, M., Guerrero, S., Olmo, R., Pastrana, L., Katime, I., & Teijon, J. (2008). Preparation and characterization of nanoparticulate poly(N-isopropylacrylamide) hydrogel for the controlled release of anti-tumour drugs. *Polymer International*, 57(11), 1215-1225. doi:10.1002/pi.2457
- Blanco, M., Bernardo, M., Sastre, R., Olmo, R., Muniz, E., & Teijon, J. (2003). Preparation of bupivacaine-loaded poly(epsilon-caprolactone) microspheres by spray drying: Drug release studies and biocompatibility. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 55(2), 229-236. doi:10.1016/S0939-6411(02)00169-8
- Blanco, M., Bernardo, M., Teijon, C., Sastre, R., & Teijon, J. (2003). Transdermal application of bupivacaine-loaded poly (acrylamide(A)-co-monomethyl itaconate) hydrogels. *International Journal of Pharmaceutics*, 255(1-2), 99-107. doi:10.1016/S0378-5173(03)0036-X
- Blanco, M., Sastre, R., Teijon, C., Olmo, R., & Teijon, J. (2006). Degradation behaviour of microspheres prepared by spray-drying poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 326(1-2), 139-147. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.07.030
- Blanco, M., Sastre, R., Teijon, C., Olmo, R., & Teijon, J. (2005). 5-fluorouracil-loaded microspheres prepared by spray-drying poly(D,L-lactide) and poly(lactide-co-glycolide) polymers: Characterization and drug release. *Journal of Microencapsulation*, 22(6), 671-682. doi:10.1080/02652040500161990
- Blanco-Prieto, M., Besseghir, K., Orsolini, P., Heimgartner, F., Deuschel, C., Merkle, H., . . . Gander, B. (1999). Importance of the test medium for the release kinetics of a somatostatin analogue from poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, 184(2), 243-250. doi:10.1016/S0378-5173(99)00118-0
- Bogush, T., Dudko, E., Bogush, E., Tikhomirov, M., Kirsanov, V., & Davydov, M. (2010). MRP as a new predictive marker of tamoxifen efficiency in treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 430(1), 36-40. doi:10.1134/S1607672910010114
- Bouwstra, J. A., & Junginger, H. E. (1993). Hydrogels. In J. Swarbrick, & J. C. Boylan (Eds.), *Encyclopedia of pharmaceutical technology* (first ed., pp. 441-465). New York: Marcel Dekker.
- Brigger, I., Dubernet, C., & Couvreur, P. (2012). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 24-36. doi:10.1016/j.addr.2012.09.006

- Brown, S., Mason, J., Jockisch, K., Hastings, R., & Moet, S. (1990). In Heimke, GS, Lee, AJC (Ed.), *The thermoductility of chopped carbon-fiber reinforced peek*. AMSTERDAM; AMSTERDAM: ELSEVIER SCIENCE PUBL B V.
- Burgess, D., & Hickey, A. (2007). Microsphere technology and applications. In J. Swarbrick (Ed.), *Encyclopedia of pharmaceutical technology* (Third ed., ) Informa Healthcare.
- Calixto, G., Bernegossi, J., Fonseca-Santos, B., & Chorilli, M. (2014). Nanotechnology-based drug delivery systems for treatment of oral cancer: A review. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 3719-3735. doi:10.2147/IJN.S61670
- Chang, T. (1964). Semipermeable microcapsules. *Science*, 146(364), 524-&. doi:10.1126/science.146.3643.524
- Chaudhury, A., & Das, S. (2011). Recent advancement of chitosan-based nanoparticles for oral controlled delivery of insulin and other therapeutic agents. *Aaps Pharmscitech*, 12(1), 10-20. doi:10.1208/s12249-010-9561-2
- Chauvel-Lebret, D., Auroy, P., & Bonnaure-Mallet, M. (2001). Biocompatibility of elastomers. In S. Dumutriu (Ed.), *Polymeric biomaterials* (Second Edition , Revised expanded ed., pp. 311-360). New York: Marcel Dekker.
- Chawla, J., & Amiji, M. (2002). Biodegradable poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen. *International Journal of Pharmaceutics*, 249(1-2), 127-138. doi:10.1016/S0378-5173(02)00483-0
- Chen, C., Cheng, Y., Yu, C., Chan, S., Cheung, M., & Yu, P. (2008). In vitro cytotoxicity, hemolysis assay, and biodegradation behavior of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate)-poly(ethylene glycol)-poly(3-hydroxybutyrate) nanoparticles as potential drug carriers. *Journal of Biomedical Materials Research Part a*, 87A(2), 290-298. doi:10.1002/jbm.a.31719
- Chen, J., Li, S., Shen, Q., He, H., & Zhang, Y. (2011). Enhanced cellular uptake of folic acid-conjugated PLGA-PEG nanoparticles loaded with vincristine sulfate in human breast cancer. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 37(11), 1339-1346. doi:10.3109/03639045.2011.575162
- Cho, E., Holback, H., Liu, K., Abouelmagd, S., Park, J., & Yeo, Y. (2013). Nanoparticle characterization: State of the art, challenges, and emerging technologies. *Molecular Pharmaceutics*, 10(6), 2093-2110. doi:10.1021/mp300697h
- Choi, H., & Frangioni, J. (2010). Nanoparticles for biomedical imaging: Fundamentals of clinical translation. *Molecular Imaging*, 9(6), 291-310. doi:10.2310/7290.2010.00031



- Coughlan, D., & Corrigan, O. (2006). Drug-polymer interactions and their effect on thermoresponsive poly(N-isopropylacrylamide) drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 313(1-2), 163-174. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.02.005
- Couvreux, P. (2013). Nanoparticles in drug delivery: Past, present and future. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(1), 21-23. doi:10.1016/j.addr.2012.04.010
- Cowsar, D., Rice, T., Gilley, R., & English, J. (1985). Poly(lactide-co-glicolide) microcapsules for controlled release of steroids. *Methods in enzymology* (pp. 101-116). Florida: Academic Press.
- da Silva-Junior, A., de Matos, J., Formariz, T., Rossanezi, G., Scarpa, M., Tabosa do Egito, E., & de Oliveira, A. (2009). Thermal behavior and stability of biodegradable spray-dried microparticles containing triamcinolone. *International Journal of Pharmaceutics*, 368(1-2), 45-55. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.09.054
- D'Antone, S., Bignotti, F., Sartore, L., D'Amore, A., Spagnoli, G., & Penco, M. (2001). Thermogravimetric investigation of two classes of block copolymers based on poly(lactic-glycolic acid) and poly(epsilon-caprolactone) or poly(ethylene glycol). *Polymer Degradation and Stability*, 74(1), 119-124. doi:10.1016/S0141-3910(01)00110-0
- Degregorio, M., Coronado, E., & Osborne, C. (1989). Tumor and serum tamoxifen concentrations in the athymic nude-mouse. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 23(2), 68-70.
- Dellacherie, E., Gref, R., & Quellec, P. (2001). Stealth, nanospheres as new injectable drug carriers: A promising way? *M S-Medecine Sciences*, 17(5), 619-626.
- des Rieux, A., Fievez, V., Garinot, M., Schneider, Y., & Preat, V. (2006). Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *Journal of Controlled Release*, 116(1), 1-27. doi:10.1016/j.jconrel.2006.08.013
- Desai, S., Simonell, A., & Higuchi, W. (1965). Investigation of factors influencing release of solid drug dispersed in inert matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54(10), 1459-&. doi:10.1002/jps.2600541012
- Dhana Lekshmi, U. M., Poovi, G., Kishore, N., & Reddy, P. N. (2010). In vitro characterization and in vivo toxicity study of repaglinide loaded poly (methyl methacrylate) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 396(1-2), 194-203. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.06.023
- Dinarvand, R., Sepehri, N., Manoochehri, S., Rouhani, H., & Atyabi, F. (2011). Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 877-895. doi:10.2147/IJN.S18905

- Dong, C., Qiu, K., Gu, Z., & Feng, X. (2000). Synthesis of poly(D,L-lactic acid-alt-glycolic acid) from D,L-3-methylglycolide. *Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry*, 38(23), 4179-4184. doi:10.1002/1099-0518(20001201)38:23<4179::AID-POLA20>3.0.CO;2-5
- Dong, L., & Hoffman, A. (1986). Thermally reversible hydrogels: III. immobilization of enzymes for feedback reaction control. *Journal of Controlled Release*, 4(3), 223-227. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0168-3659\(86\)90006-4](http://dx.doi.org/10.1016/0168-3659(86)90006-4)
- Du, J., Mao, C., Yuan, Y., Yang, X., & Wang, J. (2014). Tumor extracellular acidity-activated nanoparticles as drug delivery systems for enhanced cancer therapy. *Biotechnology Advances*, 32(4), 789-803. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.08.002
- Du, J., Sun, T., Song, W., Wu, J., & Wang, J. (2010). A tumor-acidity-activated charge-conversional nanogel as an intelligent vehicle for promoted tumoral-cell uptake and drug delivery. *Angewandte Chemie-International Edition*, 49(21), 3621-3626. doi:10.1002/anie.200907210
- Duh, J., Yu, R., Jiao, J., Matwyshyn, G., Li, W., Tan, T., & Kong, A. (1997). Activation of signal transduction kinases by tamoxifen. *Pharmaceutical Research*, 14(2), 186-189. doi:10.1023/A:1012048626963
- Dunne, M., Corrigan, O., & Ramtoola, Z. (2000). Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles. *Biomaterials*, 21(16), 1659-1668. doi:10.1016/S0142-9612(00)00040-5
- Dykes, G. (2001). Dendrimers: A review of their appeal and applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 76(9), 903-918. doi:10.1002/jctb.464
- Effects of disease on clinical laboratory tests* (2001). In Friedman R. B., Young D. S. (Eds.), (fourth ed.). Washington: AACC Press.
- Early breast cancer trialists' collaborative group. (1992). Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy. 133 randomised trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women.. *Lancet*, 339(8785), 71-85.
- Esmaili, F., Atyabi, F., & Dinarvand, R. (2007). Preparation of PLGA nanoparticles using TPGS in the spontaneous emulsification solvent diffusion method. *Journal of Experimental Nanoscience*, 2(3), 183-192. doi:10.1080/17458080701393137
- Esmaili, F., Ghahremani, M., Ostad, S., Atyabi, F., Seyedabadi, M., Malekshahi, M., . . . Dinarvand, R. (2008). Folate-receptor-targeted delivery of docetaxel nanoparticles prepared by PLGA-PEG-folate conjugate. *Journal of Drug Targeting*, 16(5), 415-423. doi:10.1080/10611860802088630
- Esmaili, F., Hosseini-Nasr, M., Rad-Malekshahi, M., Samadi, N., Atyabi, F., & Dinarvand, R. (2007). Preparation and antibacterial activity evaluation of rifampicin-loaded poly lactide-

- co-glycolide nanoparticles. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, 3(2), 161-167. doi:10.1016/j.nano.2007.03.003
- Farokhzad, O., Cheng, J., Teply, B., Sherifi, I., Jon, S., Kantoff, P., . . . Langer, R. (2006). Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(16), 6315-6320. doi:10.1073/pnas.0601755103
- Fenandez, A., Teijon, C., Benito, M., Iglesias, I., Lozano, R., Teijon, J. M., & Blanco, M. D. (2012). Tamoxifen-loaded microspheres based on mixtures of poly(D,L-lactide-co-glycolide) and poly(D,L-lactide) polymers: Effect of polymeric composition on drug release and in vitro antitumoral activity. *Journal of Applied Polymer Science*, 124(4), 2987-2998. doi:10.1002/app.35327
- Feng, S., & Chien, S. (2003). Chemotherapeutic engineering: Application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. *Chemical Engineering Science*, 58(18), 4087-4114. doi:10.1016/S0009-2509(03)00234-3
- Finke, J., Richter, C., Gothsch, T., Kwade, A., Buettgenbach, S., & Mueller-Goymann, C. (2014). Coumarin 6 as a fluorescent model drug: How to identify properties of lipid colloidal drug delivery systems via fluorescence spectroscopy? *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(9), 1234-1246. doi:10.1002/ejlt.201300413
- Folkman, J., & Long, D. M. (1964). The use of silicone rubber as a carrier for prolonged drug therapy. *The Journal of Surgical Research*, 4, 139-142. doi:10.1016/S0022-4804(64)80040-8
- Fournier, E., Passirani, C., Montero-Menei, C., & Benoit, J. (2003). Biocompatibility of implantable synthetic polymeric drug carriers: Focus on brain biocompatibility. *Biomaterials*, 24(19), 3311-3331. doi:10.1016/S0142-9612(03)00161-3
- Freiberg, S., & Zhu, X. (2004). Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, 282(1-2), 1-18. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.04.013
- Frenning, G., Brohede, U., & Stromme, M. (2005). Finite element analysis of the release of slowly dissolving drugs from cylindrical matrix systems. *Journal of Controlled Release*, 107(2), 320-329. doi:10.1016/j.jconrel.2005.06.016
- Fu, B., Hsiao, B., Chen, G., Zhou, J., Koyfman, I., Jamiolkowski, D., & Dormier, E. (2002). Structure and property studies of bioabsorbable poly(glycolide-co-lactide) fiber during processing and in vitro degradation. *Polymer*, 43(20), 5527-5534. doi:10.1016/S0032-3861(02)00389-0
- Gao, W., Chan, J., & Farokhzad, O. (2010). pH-responsive nanoparticles for drug delivery. *Molecular Pharmaceutics*, 7(6), 1913-1920. doi:10.1021/mp100253e

- Garcia, L., Aguilar, M. R., & San Román, J. (2010). Biodegradable Hydrogels for controlled drug delivery. . In R. M. Ottenbrite, K. Park & T. Okano (Eds.), *Biomedical applications of hydrogels handbook* (pp. 147-155). New York: Springer.
- Gatmaitan, Z. C., & Arias, I. M. (1993). Structure and function of P-glycoprotein in normal liver and small intestine. *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)*, 24, 77-97. doi:10.1016/S1054-3589(08)60934-5
- Gaucher, G., Marchessault, R., & Leroux, J. (2010). Polyester-based micelles and nanoparticles for the parenteral delivery of taxanes. *Journal of Controlled Release*, 143(1), 2-12. doi:10.1016/j.jconrel.2009.11.012
- Geszke, M., Murias, M., Balan, L., Medjandi, G., Korczynski, J., Moritz, M., . . . Schneider, R. (2011). Folic acid-conjugated core/shell ZnS:Mn/ZnS quantum dots as targeted probes for two photon fluorescence imaging of cancer cells. *Acta Biomaterialia*, 7(3), 1327-1338. doi:10.1016/j.actbio.2010.10.012
- Giri, T., Thakur, A., Alexander, A., Ajazuddin, Badwaik, H., & Tripathi, D. (2012). Modified chitosan hydrogels as drug delivery and tissue engineering systems: Present status and applications. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2(5), 439-449. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2012.07.004>
- Giunchedi, P., & Conte, U. (1995). Spray-drying as a preparation method of microparticulate drug-delivery systems - an overview. *Stp Pharma Sciences*, 5(4), 276-290.
- Gombotz, W., & Pettit, D. (1995). Biodegradable polymers for protein and peptide drug-delivery. *Bioconjugate Chemistry*, 6(4), 332-351. doi:10.1021/bc00034a002
- Grieshaber, A. E., Jha, A. K., Farran, A. J. E., & Jia, X. (2011). Hydrogels in tissue engineering. In J. A. Burdick, & R. L. Mauk (Eds.), *Biomaterials for tissue engineering applications* (firts ed., pp. 9-46) SpringerWinNewYork.
- Guerrero Monjo, S. (2011). *Preparación, caracterización y evaluación biológica de sistemas poliméricos micro y nanoparticulados para la liberación controlada de 5-fluorouracilo y tamoxifeno*.
- Guerrero Ramirez, L. G. (2009). *Síntesis de nanogeles copoliméricos inteligentes para su utilización en la liberación controlada y selectiva de fármacos*
- Gundimeda, U., Chen, Z., & Gopalakrishna, R. (1996). Tamoxifen modulates protein kinase C via oxidative stress in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 271(23), 13504-13514.
- Gupta, P., Vermani, K., & Garg, S. (2002). Hydrogels: From controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Discovery Today*, 7(10), 569-579. doi:10.1016/S1359-6446(02)02255-9

- Haldosen, L., Zhao, C., & Dahlman-Wright, K. (2014). Estrogen receptor beta in breast cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 382(1), 665-672. doi:10.1016/j.mce.2013.08.005
- Haley, B., & Frenkel, E.,. (2008). Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urologic Oncology-Seminars and Original Investigations*, 26(1), 57-64. doi:10.1016/j.urolonc.2007.03.015
- Hamidi, M., Azadi, A., & Rafiei, P. (2008). Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(15), 1638-1649. doi:10.1016/j.addr.2008.08.002
- Han, X., Liu, J., Liu, M., Xie, C., Zhan, C., Gu, B., . . . Lu, W. (2009). 9-NC-loaded folate-conjugated polymer micelles as tumor targeted drug delivery system: Preparation and evaluation in vitro. *International Journal of Pharmaceutics*, 372(1-2), 125-131. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.12.035
- Hartmann, L., Keeney, G., Lingle, W., Christianson, T., Varghese, B., Hillman, D., . . . Low, P. (2007). Folate receptor overexpression is associated with poor outcome in breast cancer. *International Journal of Cancer*, 121(5), 938-942. doi:10.1002/ijc.22811
- Hayashi, T. (1994). Biodegradable polymers for biomedical uses. *Progress in Polymer Science*, 19(4), 663-702. doi:10.1016/0079-6700(94)90030-2
- He, C., Hu, Y., Yin, L., Tang, C., & Yin, C. (2010). Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*, 31(13), 3657-3666. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.01.065
- Heath, D. E., & Cooper, S. L. (2013). Polymer: Basic principles. In B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen & J. E. Lemons (Eds.), *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine* (Third ed., pp. 109-124) Elsevier.
- Heller, J., & Hoffman, A. S. (2004). Drug delivery systems. In B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen & J. E. Lemons (Eds.), *Biomaterials science. an introduction to materials in medicine* (second ed., ) Elsevier Academic press.
- Hennink, W., & van Nostrum, C. (2002). Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(1), 13-36. doi:10.1016/S0169-409X(01)00240-X
- Heres-Pulido, M., Duenas-Garcia, I., Castaneda-Partida, L., Sanchez-Garcia, A., Contreras-Sousa, M., Duran-Diaz, A., & Graf, U. (2004). Genotoxicity of tamoxifen citrate and 4-nitroquinoline-1-oxide in the wing spot test of drosophila melanogaster. *Mutagenesis*, 19(3), 187-193. doi:10.1093/mutage/geh020
- Hernandez-Vargas, H., von Kobbe, C., Sanchez-Estevez, C., Julian-Tendero, M., Palacios, J., & Moreno-Bueno, G. (2007). Inhibition of paclitaxel-induced proteasome activation influences paclitaxel cytotoxicity in breast cancer cells in a sequence-dependent manner. *Cell Cycle*, 6(21), 2662-2668.

- Heslinga, M., Mastria, E., & Eniola-Adefeso, O. (2009). Fabrication of biodegradable spheroidal microparticles for drug delivery applications. *Journal of Controlled Release*, 138(3), 235-242. doi:10.1016/j.jconrel.2009.05.020
- Higuchi, T. (1961). Correlation rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspensions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50(12), 874-&. doi:10.1002/jps.2600501018
- Hittinger, E., Kokil, A., & Weder, C. (2004). Synthesis and characterization of cross-linked conjugated polymer milli-, micro-, and nanoparticles. *Angewandte Chemie-International Edition*, 43(14), 1808-1811. doi:10.1002/anie.200352863
- Hobbs, S., Monsky, W., Yuan, F., Roberts, W., Griffith, L., Torchilin, V., & Jain, R. (1998). Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(8), 4607-4612. doi:10.1073/pnas.95.8.4607
- Hollinger, J. (1983). Preliminary-report on the osteogenic potential of a biodegradable co-polymer of polyactide (pla) and polyglycolide (pga). *Journal of Biomedical Materials Research*, 17(1), 71-82. doi:10.1002/jbm.820170107
- Hooper, K., Macon, N., & Kohn, J. (1998). Comparative histological evaluation of new tyrosine-derived polymers and poly (L-lactic acid) as a function of polymer degradation. *Journal of Biomedical Materials Research*, 41(3), 443-454. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(19980905)41:3<443::AID-JBM14>3.0.CO;2-J
- Hopfenberg, H. (1976). Controlled release from erodible slabs, cylinders, and spheres. *ACS Symposium Series*, (33), 26-32.
- Horvat, M., Mestrovic, E., Danilovski, A., & Craig, D. (2005). An investigation into the thermal behaviour of a model drug mixture with amorphous trehalose. *International Journal of Pharmaceutics*, 294(1-2), 1-10. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.08.025
- Huang, R., Mocherla, S., Heslinga, M., Charoenphol, P., & Eniola-Adefeso, O. (2010). Dynamic and cellular interactions of nanoparticles in vascular-targeted drug delivery (review). *Molecular Membrane Biology*, 27(7), 312-327. doi:10.3109/09687688.2010.522117
- Humason, G. L. (1979). In Freeman W. H. (Ed.), *Animal tissue techniques*. (4th ed.). San Francisco, California, USA:
- Ikada, Y., & Tsuji, H. (2000). Biodegradable polyesters for medical and ecological applications. *Macromolecular Rapid Communications*, 21(3), 117-132. doi:10.1002/(SICI)1521-3927(20000201)21:3<117::AID-MARC117>3.3.CO;2-O
- Jain, R. (2001). Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1-3), 149-168. doi:10.1016/S0169-409X(00)00131-9

- Jalil, R., & Nixon, J. (1990). Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules - problems associated with preparative techniques and release properties. *Journal of Microencapsulation*, 7(3), 297-325. doi:10.3109/02652049009021842
- Jiang, W., & Schwendeman, S. (2001). Stabilization and controlled release of bovine serum albumin encapsulated in poly(D, L-lactide) and poly(ethylene glycol) microsphere blends. *Pharmaceutical Research*, 18(6), 878-885. doi:10.1023/A:1011009117586
- Jones, H. (1997). Record of the first physician to see henrietta lacks at the johns hopkins hospital: History of the beginning of the HeLa cell line. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 176(6), S227-S228. doi:10.1016/S0002-9378(97)70379-X
- Jordan, V. (2007). New insights into the metabolism of tamoxifen and its role in the treatment and prevention of breast cancer. *Steroids*, 72(13), 829-842. doi:10.1016/j.steroids.2007.07.009
- Jordan, V., Collons, M., Rowsby, L., & Prestwich, G. (1977). Monohydroxylated metabolite of tamoxifen with potent anti-estrogenic activity. *Journal of Endocrinology*, 75(2), 305-316. doi:10.1677/joe.0.0750305
- Kamaly, N., Xiao, Z., Valencia, P., Radovic-Moreno, A., & Farokhzad, O. (2012). Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: Design, development and clinical translation. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2971-3010. doi:10.1039/c2cs15344k
- Kilicay, E., Demirbilek, M., Turk, M., Guven, E., Hazer, B., & Denkbaz, E. (2011). Preparation and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHX) based nanoparticles for targeted cancer therapy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 44(3), 310-320. doi:10.1016/j.ejps.2011.08.013
- Kim, S., Jeong, J., Lee, S., Kim, S., & Park, T. (2008). LHRH receptor-mediated delivery of siRNA using polyelectrolyte complex micelles self-assembled from siRNA-PEG-LHRH conjugate and PEI. *Bioconjugate Chemistry*, 19(11), 2156-2162. doi:10.1021/bc800249n
- Kisanga, E., Gierde, J., Schjott, J., Mellgren, G., & Lien, E. (2003). Tamoxifen administration and metabolism in nude mice and nude rats. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 84(2-3), 361-367. doi:10.1016/S0960-0760(03)00051-7
- Kisanga, E., Moi, L., Gjerde, J., Mellgren, G., & Lien, E. (2005). Induction of hepatic drug-metabolising enzymes and tamoxifen metabolite profile in relation to administration route during low-dose treatment in nude rats. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 94(5), 489-498. doi:10.1016/j.jsbmb.2004.12.037
- Kocbek, P., Obermajer, N., Cegnar, M., Kos, J., & Kristl, J. (2007). Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody. *Journal of Controlled Release*, 120(1-2), 18-26. doi:10.1016/j.jconrel.2007.03.012

- Kulkarni, R., Pani, K., Neuman, C., & Leonard, F. (1966). Polylactic acid for surgical implants. *Archives of Surgery*, 93(5), 839-&.
- Kumar, B., & Lutful, A. (2014). Nanotechnology in cancer drug delivery and selective targeting. *ISRN Nanotechnology*, , 12.
- Kumari, A., Yadav, S., & Yadav, S. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 75(1), 1-18. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.09.001
- Kura, A., Fakurazi, S., Hussein, M., & Arulselvan, P. (2014). Nanotechnology in drug delivery: The need for more cell culture based studies in screening. *Chemistry Central Journal*, 8, 46. doi:10.1186/1752-153X-8-46
- Kushner, P., Agard, D., Greene, G., Scanlan, T., Shiau, A., Uht, R., & Webb, P. (2000). Estrogen receptor pathways to AP-1. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 74(5), 311-317. doi:10.1016/S0960-0760(00)00108-4
- Langer, R. (2000). Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: One laboratory's experience. *Accounts of Chemical Research*, 33(2), 94-101. doi:10.1021/ar9800993
- Langer, R., Cima, L., Tamada, J., & Wintermantel, E. (1990). Future-directions in biomaterials. *Biomaterials*, 11(9), 738-745. doi:10.1016/0142-9612(90)90038-R
- Langer, R., & Peppas, N. (1983). Chemical and physical structure of polymers as carriers for controlled release of bioactive agents - a review. *Journal of Macromolecular Science-Reviews in Macromolecular Chemistry and Physics*, C23(1), 61-126.
- Langer, R., & Peppas, N. (1981). Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems. *Biomaterials*, 2(4), 201-214. doi:10.1016/0142-9612(81)90059-4
- Laskin, J., & Sandier, A. (2004). Epidermal growth factor receptor: A promising target in solid tumours. *Cancer Treatment Reviews*, 30(1), 1-17. doi:10.1016/j.ctrv.2003.10.002
- Lee, K. H., Ward, B. A., Desta, Z., Flockhart, D. A., & Jones, D. R. (2003). Quantification of tamoxifen and three metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: Application to a clinical trial. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 791(1-2), 245-253. doi:10.1016/S1570-0232(03)00218-6
- Lemaire, V., Belair, J., & Hildgen, P. (2003). Structural modeling of drug release from biodegradable porous matrices based on a combined diffusion/erosion process. *International Journal of Pharmaceutics*, 258(1-2), 95-107. doi:10.1016/S0378-5173(03)00165-0



- Levy-Nissenbaum, E., Radovic-Moreno, A., Wang, A., Langer, R., & Farokhzad, O. (2008). Nanotechnology and aptamers: Applications in drug delivery. *Trends in Biotechnology*, 26(8), 442-449. doi:10.1016/j.tibtech.2008.04.006
- Li, X., Lie, R., Qian, X., Ding, Y., Tu, Y., Guo, R., . . . Liu, B. (2008). Superior antitumor efficiency of cisplatin-loaded nanoparticles by intratumoral delivery with decreased tumor metabolism rate. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70(3), 726-734. doi:10.1016/j.ejpb.2008.06.016
- Li, X., Deng, X., & Huang, Z. (2001). In vitro protein release and degradation of poly-dl-lactide-poly(ethylene glycol) microspheres with entrapped human serum albumin: Quantitative evaluation of the factors involved in protein release phases. *Pharmaceutical Research*, 18(1), 117-124. doi:10.1023/A:1011043230573
- Liang, C., Yang, Y., Ling, Y., Huang, Y., Li, T., & Li, X. (2011). Improved therapeutic effect of folate-decorated PLGA-PEG nanoparticles for endometrial carcinoma. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19(13), 4057-4066. doi:10.1016/j.bmc.2011.05.016
- Liechty, W., & Peppas, N. (2012). Expert opinion: Responsive polymer nanoparticles in cancer therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 80(2), 241-246. doi:10.1016/j.ejpb.2011.08.004
- Lin, C., & Metters, A. (2006). Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(12-13), 1379-1408. doi:10.1016/j.addr.2006.09.004
- Liu, J., Lau, S., Varma, V., Kairdolf, B., & Nie, S. (2010). Multiplexed detection and characterization of rare tumor cells in hodgkin's lymphoma with multicolor quantum dots. *Analytical Chemistry*, 82(14), 6237-6243. doi:10.1021/ac101065b
- Liu, S., Wiradharma, N., Gao, S., Tong, Y., & Yang, Y. (2007). Bio-functional micelles self-assembled from a folate-conjugated block copolymer for targeted intracellular delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*, 28(7), 1423-1433. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.11.013
- Liu, W., Yang, X., & Ho, W. (2011). Preparation of uniform-sized multiple emulsions and Micro/Nano particulates for drug delivery by membrane emulsification. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(1), 75-93. doi:10.1002/jps.22272
- Loomis, K., McNeeley, K., & Bellamkonda, R. (2011). Nanoparticles with targeting, triggered release, and imaging functionality for cancer applications. *Soft Matter*, 7(3), 839-856. doi:10.1039/c0sm00534g
- Low, P., & Antony, A. (2004). Folate receptor-targeted drugs for cancer and inflammatory diseases - preface. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(8), 1055-1058. doi:10.1016/j.addr.2004.02.003

- Lu, J., Li, Z., Zink, J., & Tamanoi, F. (2012). In vivo tumor suppression efficacy of mesoporous silica nanoparticles-based drug-delivery system: Enhanced efficacy by folate modification. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, 8(2), 212-220. doi:10.1016/j.nano.2011.06.002
- Lu, Y., & Low, P. (2003). Immunotherapy of folate receptor-expressing tumors: Review of recent advances and future prospects. *Journal of Controlled Release*, 91(1-2), 17-29. doi:10.1016/S0168-2659(03)00215-3
- Luck, M., Pistel, K., Li, Y., Blunk, T., Muller, R., & Kissel, T. (1998). Plasma protein adsorption on biodegradable microspheres consisting of poly(D,L-lactide-co-glycolide), poly(L-lactide) or ABA triblock copolymers containing poly(oxyethylene) - influence of production method and polymer composition. *Journal of Controlled Release*, 55(2-3), 107-120. doi:10.1016/S0168-3659(98)00030-3
- MacCallum, J., Cummings, J., Dixon, J., & Miller, W. (1996). Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic determination of tamoxifen and its major metabolites in plasma. *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications*, 678(2), 317-323. doi:10.1016/0378-4347(95)00530-7
- Maeda, H., & Matsumura, Y. (2011). EPR effect based drug design and clinical outlook for enhanced cancer chemotherapy preface. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(3), 129-130. doi:10.1016/j.addr.2010.05.001
- Magnusson, J., Saeed, A., Fernandez-Trillo, F., & Alexander, C. (2011). Synthetic polymers for biopharmaceutical delivery. *Polymer Chemistry*, 2(1), 48-59. doi:10.1039/c0py00210k
- Mainardes, R., & Silva, L. (2004). Drug delivery systems: Past, present, and future. *Current Drug Targets*, 5(5), 449-455. doi:10.2174/1389450043345407
- Maji, R., Dey, N., Satapathy, B., Mukherjee, B., & Mondal, S.,. (2014). Preparation and characterization of tamoxifen citrate loaded nanoparticles for breast cancer therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 3107-3118. doi:10.2147/IJN.S63535
- Manchanda, R., Fernandez-Fernandez, A., Nagesetti, A., & McGoron, A. (2010). Preparation and characterization of a polymeric (PLGA) nanoparticulate drug delivery system with simultaneous incorporation of chemotherapeutic and thermo-optical agents. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 75(1), 260-267. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.08.043
- Manoochchhri, S., Darvishi, B., Kamalinia, G., Amini, M., Fallah, M., Ostad, S., . . . Dinarvand, R. (2013). Surface modification of PLGA nanoparticles via human serum albumin conjugation for controlled delivery of docetaxel. *Daru-Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21, 58. doi:10.1186/2008-2231-21-58

- Mansouri, S., Cuie, Y., Winnik, F., Shi, Q., Lavigne, P., Benderdour, M., . . . Fernandes, J. (2006). Characterization of folate-chitosan-DNA nanoparticles for gene therapy. *Biomaterials*, 27(9), 2060-2065. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.09.020
- Martínez Palau, M. (2008). *Síntesis, estructura y aplicaciones de poliésteres secuenciales derivados de ácido glicólico y w-hidroxiácidos*
- Martinez, A., Arana, P., Fernandez, A., Olmo, R., Teijon, C., & Blanco, M. D. (2013). Synthesis and characterisation of alginate/chitosan nanoparticles as tamoxifen controlled delivery systems. *Journal of Microencapsulation*, 30(4), 398-408. doi:10.3109/02652048.2012.746747
- Martinez, A., Benito-Miguel, M., Iglesias, I., Teijon, J. M., & Blanco, M. D. (2012). Tamoxifen-loaded thiolated alginate-albumin nanoparticles as antitumoral drug delivery systems. *Journal of Biomedical Materials Research Part a*, 100A(6), 1467-1476. doi:10.1002/jbm.a.34051
- Martinez, A., Iglesias, I., Lozano, R., Teijon, J. M., Blanco, M. D., & Grp Polymeric Mat Controlled. (2011). Synthesis and characterization of thiolated alginate-albumin nanoparticles stabilized by disulfide bonds. evaluation as drug delivery systems. *Carbohydrate Polymers*, 83(3), 1311-1321. doi:10.1016/j.carbpol.2010.09.038
- Martinez, A., Olmo, R., Iglesias, I., Teijon, J. M., & Blanco, M. D. (2014). Folate-targeted nanoparticles based on albumin and Albumin/Alginate mixtures as controlled release systems of tamoxifen: Synthesis and in vitro characterization. *Pharmaceutical Research*, 31(1), 182-193. doi:10.1007/s11095-013-1151-z
- Mason, N., Thies, C., & Cicero, T. (1976). In vivo and in vitro evaluation of a microencapsulated narcotic-antagonist. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 65(6), 847-850. doi:10.1002/jps.2600650612
- Master, K. (1991). In Jon Wiley & Sons (Ed.), *Spray drying handbook* (5th ed.). New York: Longman Scientific & Technical.
- Mi, F., Kuan, C., Shyu, S., Lee, S., & Chang, S. (2000). The study of gelation kinetics and chain-relaxation properties of glutaraldehyde-cross-linked chitosan gel and their effects on microspheres preparation and drug release. *Carbohydrate Polymers*, 41(4), 389-396. doi:10.1016/S0144-8617(99)00104-6
- Miller, M., & Katzenellenbogen, B. (1983). Characterization and quantitation of anti-estrogen binding-sites in estrogen receptor-positive and receptor-negative human-breast cancer cell-lines. *Cancer Research*, 43(7), 3094-3100.
- Minko, T. (2012). Receptor mediated delivery systems for cancer therapeutics. In J. Siepmann, R. A. Siegel & M. J. Rathbone (Eds.), *Fundamentals and applications of controlled release drug delivery* (pp. 329) Springer.

- Mirakabad, F., Nejati-Koshki, K., Akbarzadeh, A., Yamchi, M., Milani, M., Zarghami, N., . . . Joo, S. (2014). PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(2), 517-535. doi:10.7314/APJCP.2014.15.2.517
- Mitchell, R. N. (2013). Innate and adaptive immunity: The immune response to foreign materials. In B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen & J. E. Lemons (Eds.), *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine* (third ed., pp. 512-533) Academic Press.
- Moghimi, S., Hunter, A., & Murray, J. (2005). Nanomedicine: Current status and future prospects. *Faseb Journal*, 19(3), 311-330. doi:10.1096/fj.04-2747rev
- Moiseev, Y., & Zaikov, G. (1987). *Chemical resistance of polymers in aggressive media*. New York: Plenum Publishing Corporation.
- Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., & Elaissari, A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 385(1-2), 113-142. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.10.018
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival - application to proliferation and cyto-toxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
- Muftuler, F., Unak, P., Teksoz, S., Acar, C., Yolcular, S., & Yurekli, Y. (2008). I-131 labeling of tamoxifen and biodistribution studies in rats. *Applied Radiation and Isotopes*, 66(2), 178-187. doi:10.1016/j.apradiso.2007.08.005
- Mukherjee, B., Roy, G., Santra, K., & Sahana, B. (2010). Lactide-glycolide polymers as nanodimensional carriers for drugs. *International Journal of Biomedical Nanoscience Nanotechnology*, 1, 230-246.
- Mundargi, R., Babu, V., Rangaswamy, V., Patel, P., & Aminabhavi, T. (2008). Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *Journal of Controlled Release*, 125(3), 193-209. doi:10.1016/j.jconrel.2007.09.013
- Murillo, M., Gamazo, C., Goni, M., Irache, J., & Blanco-Prieto, M. (2002). Development of microparticles prepared by spray-drying as a vaccine delivery system against brucellosis. *International Journal of Pharmaceutics*, 242(1-2), 341-344. doi:10.1016/S0378-5173(02)00212-0
- Naahidi, S., Jafari, M., Edalat, F., Raymond, K., Khademhosseini, A., & Chen, P. (2013). Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 166(2), 182-194. doi:10.1016/j.jconrel.2012.12.013
- Nahta, R., & Esteva, F. (2006). Herceptin: Mechanisms of action and resistance. *Cancer Letters*, 232(2), 123-138. doi:10.1016/j.canlet.2005.01.041

- Nair, L., & Laurencin, C. (2007). Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*, 32(8-9), 762-798. doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017
- Nanjwade, B., Bechra, H., Derkar, G., Manvi, F., & Nanjwade, V. (2009). Dendrimers: Emerging polymers for drug-delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 38(3), 185-196. doi:10.1016/j.ejps.2009.07.008
- Narayani, R., & Rao, K. (1996). Gelatin microsphere cocktails of different sizes for the controlled release of anticancer drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 143(2), 255-258. doi:10.1016/S0378-5173(96)04685-6
- Nevozhay, D., Kanska, U., Budzynska, R., & Boratynski, J. (2007). [Current status of research on conjugates and related drug delivery systems in the treatment of cancer and other diseases]. [Współczesny stan badan nad koniugatami i innymi systemami dostarczania lekow w leczeniu schorzen nowotworowych i innych jednostek chorobowych.] *Postępy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej (Online)*, 61, 350-360.
- Nie, S. (2010). Understanding and overcoming major barriers in cancer nanomedicine. *Nanomedicine*, 5(4), 523-528. doi:10.2217/NNM.10.23
- Niwa, T., Takeuchi, H., Hino, T., Kunoou, N., & Kawashima, Y. (1993). Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D,L-lactide glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior. *Journal of Controlled Release*, 25(1-2), 89-98. doi:10.1016/0168-3659(93)90097-O
- Ohta, M., & Buckton, G. (2005). A study of the differences between two amorphous spray-dried samples of cefditoren pivoxil which exhibited different physical stabilities. *International Journal of Pharmaceutics*, 289(1-2), 31-38. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.09.029
- Onoue, S., Yamada, S., & Chan, H. (2014). Nanodrugs: Pharmacokinetics and safety. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 1025-1037. doi:10.2147/IJN.S38378
- Orava, E., Cicmil, N., & Gariepy, J. (2010). Delivering cargoes into cancer cells using DNA aptamers targeting internalized surface portals. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1798(12), 2190-2200. doi:10.1016/j.bbamem.2010.02.004
- Orive, G., Gascon, A., Hernandez, R., Dominguez-Gil, A., & Pedraz, J. (2004). Techniques: New approaches to the delivery of biopharmaceuticals. *Trends in Pharmacological Sciences*, 25(7), 382-387. doi:10.1016/j.tips.2004.05.006
- Owens, D., & Peppas, N. (2006). Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 307(1), 93-102. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.10.010

- Pachence, J., & Kohn, J. (1997). In Lanza R., Langer R. and Chick W. (Eds.), *Principles of tissue engineering*. New York: Academic Press.
- Panyam, J., Sahoo, S., Prabha, S., Bargar, T., & Labhasetwar, V. (2003). Fluorescence and electron microscopy probes for cellular and tissue uptake of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 262(1-2), 1-11. doi:10.1016/S0378-5173(03)00295-3
- Parhi, P., Mohanty, C., & Sahoo, S. (2012). Nanotechnology-based combinational drug delivery: An emerging approach for cancer therapy. *Drug Discovery Today*, 17(17-18), 1044-1052. doi:10.1016/j.drudis.2012.05.010
- Patel, H. B., Patel, H. L., Shah, Z. H., & Modasiya, M. K. (2011). Review on hydrogel nanoparticles in drug delivery. *American Journal of PharmaTech Research*, 1(3), 19-38.
- Patra, H. K., & Turner, A. P. F. (2014). The potential legacy of cancer nanotechnology: Cellular selection. *Trends in Biotechnology*, 32(1), 21-31. doi:10.1016/j.tibtech.2013.10.004
- Peer, D., Karp, J., Hong, S., Farokhzad, O., Margalit, R., & Langer, R. (2007). Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*, 2(12), 751-760. doi:10.1038/nnano.2007.387
- Penco, M., Sartore, L., Bignotti, F., D'Antone, S., & Di Landro, L. (2000). Thermal properties of a new class of block copolymers based on segments of poly(D,L-lactic-glycolic acid) and poly(epsilon-caprolactone). *European Polymer Journal*, 36(5), 901-908. doi:10.1016/S0014-3057(99)00155-X
- Peppas, N. A., & Hoffman, A. S. (2013). Hydrogels. In B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen & J. E. Lemons (Eds.), *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine* (third ed., pp. 166-178) Academic Press (Elsevier).
- Peppas, N. (1985). Analysis of fickian and non-fickian drug release from polymers. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 60(4), 110-111.
- Peppas, N., & Langer, R. (1994). New challenges in biomaterials. *Science*, 263(5154), 1715-1720. doi:10.1126/science.8134835
- Peppas, N., & Leobandung, W. (2004). Stimuli-sensitive hydrogels: Ideal carriers for chronobiology and chronotherapy. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, 15(2), 125-144. doi:10.1163/156856204322793539
- Perez, E., Benito, M., Teijon, C., Olmo, R., Teijon, J., & Blanco, M. (2012). Tamoxifen-loaded nanoparticles based on a novel mixture of biodegradable polyesters: Characterization and in vitro evaluation as sustained release systems. *Journal of Microencapsulation*, 29(4), 309-322. doi:10.3109/02652048.2011.651496

- Perez, E., Fernandez, A., Olmo, R., Teijon, J., & Blanco, M. (2014). pH and glutathion-responsive hydrogel for localized delivery of paclitaxel. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 116, 247-256. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.01.004
- Perez, E., Martinez, A., Teijon, C., Teijon, J., & Blanco, M. (2014). Bioresponsive nanohydrogels based on HEAA and NIPA for poorly soluble drugs delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 470(1-2), 107-119. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.05.002
- Perez-Alvarez, L., Saez-Martinez, V., Hernaez, E., Herrero, M., & Katime, I. (2009). Specific pH-responsive folate-conjugate microgels designed for antitumor therapy. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 210(6), 467-477. doi:10.1002/macp.200800496
- Perez-Alvarez, L., Saez-Martinez, V., Hernaez, E., & Katime, I. (2008). Synthesis and characterization of pH-sensitive microgels by derivatization of npa-based reactive copolymers. *Materials Chemistry and Physics*, 112(2), 516-524. doi:10.1016/j.matchemphys.2008.05.100
- Phillips, M., Gran, M., & Peppas, N. (2010). Targeted nanodelivery of drugs and diagnostics. *Nano Today*, 5(2), 143-159. doi:10.1016/j.nantod.2010.03.003
- Pietzonka, P., Rothen-Rutishauser, B., Langguth, P., Wunderli-Allenspach, H., Walter, E., & Merkle, H. (2002). Transfer of lipophilic markers from PLGA and polystyrene nanoparticles to caco-2 monolayers mimics particle uptake. *Pharmaceutical Research*, 19(5), 595-601. doi:10.1023/A:1015393710253
- Pikabea, A., Ramos, J., & Forcada, J. (2014). Production of cationic nanogels with potential use in controlled drug delivery. *Particle & Particle Systems Characterization*, 31(1), 101-109. doi:10.1002/ppsc.201300265
- Pillai, J., Thulasidasan, A., Anto, R., Chithralekha, D., Narayanan, A., & Kumar, G. (2014). Folic acid conjugated cross-linked acrylic polymer (FA-CLAP) hydrogel for site specific delivery of hydrophobic drugs to cancer cells. *Journal of Nanobiotechnology*, 12, 25. doi:10.1186/1477-3155-12-25
- Qian, Z., Li, H., Sun, H., & Ho, K. (2002). Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacological Reviews*, 54(4), 561-587. doi:10.1124/pr.54.4.561
- Qiu, Y., & Park, K. (2001). Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 53(3), 321-339. doi:10.1016/S0169-409X(01)00203-4
- Raman, C., Berklund, C., Kim, K., & Pack, D. (2005). Modeling small-molecule release from PLG microspheres: Effects of polymer degradation and nonuniform drug distribution. *Journal of Controlled Release*, 103(1), 149-158. doi:10.1016/j.conrel.2004.11.012

- Reddy, J., & Low, P. (1998). Folate-mediated targeting of therapeutic and imaging agents to cancers. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 15(6), 587-627.
- Reed, A., & Gilding, D. (1981). Biodegradable polymers for use in surgery - poly(glycolic)-poly(lactic acid) homo and co-polymers .2. invitro degradation. *Polymer*, 22(4), 494-498. doi:10.1016/0032-3861(81)90168-3
- Remaut, K., Lucas, B., Braeckmans, K., Demeester, J., & De Smedt, S. C. (2007). Pegylation of liposomes favours the endosomal degradation of the delivered phosphodiester oligonucleotides. *Journal of Controlled Release*, 117(2), 256-266. doi:10.1016/j.jconrel.2006.10.029
- Riggins, R., Schrecengost, R., Guerrero, M., & Bouton, A. (2007). Pathways to tamoxifen resistance. *Cancer Letters*, 256(1), 1-24. doi:10.1016/j.canlet.2007.03.016
- Ritger, P. L., & Peppas, N. A. (1987a). A simple equation for description of solute release I. fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of Controlled Release*, 5(1), 23-36. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0168-3659\(87\)90034-4](http://dx.doi.org/10.1016/0168-3659(87)90034-4)
- Ritger, P. L., & Peppas, N. A. (1987b). A simple equation for description of solute release II. fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of Controlled Release*, 5(1), 37-42. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0168-3659\(87\)90035-6](http://dx.doi.org/10.1016/0168-3659(87)90035-6)
- Robinson, S., Langanfahey, S., & Jordan, V. (1989). Implications of tamoxifen metabolism in the athymic mouse for the study of antitumor effects upon human breast-cancer xenografts. *European Journal of Cancer & Clinical Oncology*, 25(12), 1769-1776. doi:10.1016/0277-5379(89)90347-7
- Romero, M., & Carlo, S. (2008). *Efectos de la exposición a dosis bajas de níquel y berilio en animales de experimentación: Alteraciones oxidativas*
- Roney, C., Kulkarni, P., Arora, V., Antich, P., Bonte, F., Wu, A., . . . Aminabhavi, T. (2005). Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood-brain barrier for alzheimer's disease. *Journal of Controlled Release*, 108(2-3), 193-214. doi:10.1016/j.jconrel.2005.07.024
- Ruenraroengsak, P., Cook, J., & Florence, A. (2010). Nanosystem drug targeting: Facing up to complex realities. [ ] *Journal of Controlled Release*, 141(3), 265-276. doi:10.1016/j.jconrel.2009.10.032
- Saehney, A., & Drumheller, P. (1998). Polymer synthesis. In C. Patrick, A. Mikos & L. McIntire (Eds.), *Frontiers in tissue engineering* (1st ed., pp. 83-106). New York, NY, USA: Pergamon, Oxford, U.K.



- Sah, H., Toddywala, R., & Chien, Y. (1995). Biodegradable microcapsules prepared by a W/o/w technique - effects of shear force to make a primary W/o emulsion on their morphology and protein release. *Journal of Microencapsulation*, 12(1), 59-69. doi:10.3109/02652049509051127
- Sahoo, S., & Labhasetwar, V. (2003). Nanotech approaches to delivery and imaging drug. *Drug Discovery Today*, 8(24), 1112-1120. doi:10.1016/S1359-6446(03)02903-9
- Saito, S., Konno, M., & Inomata, H. (1993). Volume phase-transition of N-alkylacrylamide gels. *Advances in Polymer Science*, 109, 207-232.
- Sastre, R., Olmo, R., Teijon, C., Muniz, E., Teijon, J., & Blanco, M. (2007). 5-fluorouracil plasma levels and biodegradation of subcutaneously injected drug-loaded microspheres prepared by spray-drying poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 338(1-2), 180-190. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.02.001
- Schimmel, K., Richel, D., van den Brink, R., & Guchelaar, H. (2004). Cardiotoxicity of cytotoxic drugs. *Cancer Treatment Reviews*, 30(2), 181-191. doi:10.1016/j.ctrv.2003.07.003
- Schoener, C., Hutson, H., & Peppas, N. (2013). pH-responsive hydrogels with dispersed hydrophobic nanoparticles for the oral delivery of chemotherapeutics. *Journal of Biomedical Materials Research Part a*, 101(8), 2229-2236. doi:10.1002/jbm.a.34532
- Shah, N., Chaudhari, K., Dantuluri, P., Murthy, R., & Das, S. (2009). Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles surface modified with transferrin and pluronic (R) P85, an in vitro cell line and in vivo biodistribution studies on rat model. *Journal of Drug Targeting*, 17(7), 533-542. doi:10.1080/10611860903046628
- Shah, V., Midha, K., Dighe, S., McGilveray, I., Skelly, J., Yacobi, A., . . . Spector, S. (1992). Analytical methods validation - bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81(3), 309-312. doi:10.1002/jps.2600810324
- Shang, Y., & Brown, M. (2002). Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science*, 295(5564), 2465-2468. doi:10.1126/science.1068537
- Shapiro, D., & Fugmann, R. (1957). A role for chemotherapy as an adjunct to surgery. *Cancer Research*, 17(11), 1098-1101.
- Shen, W. (1995). Preparation, characterization, and drug delivery applications of microspheres based on biodegradable lactic/glycolic acid polymers. In D. Wise, D. Trantolo, D. Altobelli, M. Yaszemski, J. Gresser & E. Schwartz (Eds.), *Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering* (pp. 1151-2000). New York: Marcel Dekker.

- Shim, T., Kim, S., & Yang, S. (2013). Elaborate design strategies toward novel microcarriers for controlled encapsulation and release. *Particle & Particle Systems Characterization*, 30(1), 9-45. doi:10.1002/ppsc.201200044
- Shin, S., Choi, J., & Li, X. (2006). Enhanced bioavailability of tamoxifen after oral administration of tamoxifen with quercetin in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, 313(1-2), 144-149. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.01.028
- Siepmann, J., & Siepmann, F. (2008). Mathematical modeling of drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 364(2), 328-343. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.09.004
- Silva, R., Ferreira, H., & Cavaco-Paulo, A. (2011). Sonoproduction of liposomes and protein particles as templates for delivery purposes. *Biomacromolecules*, 12(10), 3353-3368. doi:10.1021/bm200658b
- Slaughter, B., Khurshid, S., Fisher, O., Khademhosseini, A., & Peppas, N. (2009). Hydrogels in regenerative medicine. *Advanced Materials*, 21(32-33), 3307-3329. doi:10.1002/adma.200802106
- Soares, J., Santos, J., Chierice, G., & Cavaleiro, E. (2004). Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. *Eclética Química*, 29(2)
- Starm, G., Belliot, S., Daemen, T., & Lasic, D. (1995). Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 17(1), 31-48. doi:10.1016/0169-409X(95)00039-A
- Stern, S., & McNeil, S. (2008). Nanotechnology safety concerns revisited. *Toxicological Sciences*, 101(1), 4-21. doi:10.1093/toxsci/kfm169
- Stohelin, A., & Liedtke, H. (1995). In Skov H. (Ed.), *Medical plastics*. Denmark: Hexagon Holding ApS.
- Strickland, L. A., Ponce, Y. Z., Hunter, D. H., Zabel, P. L., Powe, J. E., Morrissey, G., . . . Tustanoff, E. R. (1990). Amino and iodotamoxifens: Synthesis, estrogen receptor affinity and biodistribution. *Drug Design and Delivery*, 6(3), 195-212.
- Sun, T., Zhang, Y., Pang, B., Hyun, D., Yang, M., & Xia, Y. (2014). Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy. *Angewandte Chemie-International Edition*, 53(46), 12320-12364. doi:10.1002/anie.201403036
- Sun, T., Du, J., Yao, Y., Mao, C., Dou, S., Sun, T., . . . Wang, J. (2011). Simultaneous delivery of siRNA and paclitaxel via a "two-in-one" micelleplex promotes synergistic tumor suppression. *Acs Nano*, 5(2), 1483-1494. doi:10.1021/nn103349h

- Sunderland, C., Steiert, M., Talmadge, J., Derfus, A., & Barry, S. (2006). Targeted nanoparticles for detecting and treating cancer. *Drug Development Research*, 67(1), 70-93. doi:10.1002/ddr.20069
- Suri, S., Ruan, G., Winter, J., & Schmid, E. (2013). Microparticles and nanoparticles. In B. D. Ratner (Ed.), *Biomaterial science: An introduction to materials in medicine* (Third ed., pp. 405) Elsevier.
- Sutradhar, K. B., & Amin, M. L. (2013). Nanoemulsions: increasing possibilities in drug delivery. *European Journal of Nanomedicine*, 5(2), 97-110.
- Svenson, S., & Tomalia, D. (2005). Commentary - dendrimers in biomedical applications - reflections on the field. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(15), 2106-2129. doi:10.1016/j.addr.2005.09.018
- Talekar, M., Kendall, J., Denny, W., & Garg, S. (2011). Targeting of nanoparticles in cancer: Drug delivery and diagnostics. *Anti-Cancer Drugs*, 22(10), 949-962. doi:10.1097/CAD.0b013e32834a4554
- Tedjarati, S., Baker, C., Apte, S., Huang, S., Wolf, J., Killion, J., & Fidler, I. (2002). Synergistic therapy of human ovarian carcinoma implanted orthotopically in nude mice by optimal biological dose of pegylated interferon alpha combined with paclitaxel. *Clinical Cancer Research*, 8(7), 2413-2422.
- Teijon, C., Guerrero, S., Olmo, R., Teijon, J., & Blanco, M. (2009). Swelling properties of copolymeric hydrogels of poly(ethylene glycol) monomethacrylate and monoesters of itaconic acid for use in drug delivery. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 91B(2), 716-726. doi:10.1002/jbm.b.31448
- Theeuwes, F., & Yum, S. (1976). Principles of design and operation of generic osmotic pumps for delivery of semisolid or liquid drug formulations. *Annals of Biomedical Engineering*, 4(4), 343-353. doi:10.1007/BF02584524
- Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics* (2005). In Burtis C. A., Ashwood E. R., Bruns D. E. and Saunders W. B. (Eds.), (fourth ed.) Elsevier.
- Torchilin, V., & Trubetskoy, V. (1995). Which polymers can make nanoparticulate drug carriers long-circulating. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 16(2-3), 141-155. doi:10.1016/0169-409X(95)00022-Y
- Treiser, M., Abramson, S., Langer, R., & Kohn, J. (2013). Degradable and resorbable biomaterials. In B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen & J. E. Lemons (Eds.), *Biomaterial science: An introduction to materials in medicine* (Third ed., pp. 179-240) Elsevier.

- Vauthier, C., Dubernet, C., Chauvierre, C., Brigger, I., & Couvreur, P. (2003). Drug delivery to resistant tumors: The potential of poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 93(2), 151-160. doi:10.1016/j.jconrel.2003.08.005
- Vila Jato, J. L. (2009). In Jose Luis Vila Jato (Ed.), *Tecnología farmacéutica 2: Formas farmacéuticas*. Madrid: Sintesis.
- Vilos, C., & Velasquez, L. A. (2012). Therapeutic strategies based on polymeric microparticles. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 672760. doi:10.1155/2012/672760
- Walter, P., Green, S., Greene, G., Krust, A., Bornert, J., Jeltsch, J., . . . Chambom, P. (1985). Cloning of the human estrogen-receptor cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(23), 7889-7893. doi:10.1073/pnas.82.23.7889
- Wang, F., & Wang, C. (2003). Etanidazole-loaded microspheres fabricated by spray-drying different poly(lactide/glycolide) polymers: Effects on microsphere properties. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, 14(2), 157-183. doi:10.1163/156856203321142597
- Wang, L., Chuang, M., & Ho, J. (2012). Nanotheranostics - a review of recent publications. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 4679-4695. doi:10.2147/IJN.S33065
- Wermuth, C. G. (2002). In Camille G. (Ed.), *Practice of medicinal chemistry*. (segunda ed.). Londres: Academic Press.
- Widakowich, C., de Azambuja, E., Gil, T., Cardoso, F., Dinh, P., Awada, A., & Piccart-Gebhart, M. (2007). Molecular targeted therapies in breast cancer: Where are we now? *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(7-8), 1375-1387. doi:10.1016/j.biocel.2007.04.015
- Wilczewska, A., Niemirowicz, K., Markiewicz, K., & Car, H. (2012). Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological Reports*, 64(5), 1020-1037.
- Williams, D. F. (1987). Definitions in biomaterials. (pp. 49). Amsterdam: Elsevier.
- Williams, D. F. (1992). Mechanisms of biodegradation of implantable polymers. *Clinical Materials*, 10(1-2), 9-12. doi:10.1016/0267-6605(92)90078-8
- Williams, D. (2015). Regulatory biocompatibility requirements for biomaterials used in regenerative medicine. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 26(2), 89. doi:10.1007/s10856-015-5421-7
- Williams, D. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29(20), 2941-2953. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.04.023

- Wischke, C., Zhang, Y., Mittal, S., & Schwendeman, S. (2010). Development of PLGA-based injectable delivery systems for hydrophobic fenretinide. *Pharmaceutical Research*, 27(10), 2063-2074. doi:10.1007/s11095-010-0202-y
- Wong, T., Colombo, G., & Sonvico, F. (2011). Pectin matrix as oral drug delivery vehicle for colon cancer treatment. *Aaps Pharmscitech*, 12(1), 201-214. doi:10.1208/s12249-010-9564-z
- Xia, X., Yang, M., Wang, Y. i., Zheng, Y., Li, Q., Chen, J., & Xia, Y. (2012). Quantifying the coverage density of poly(ethylene glycol) chains on the surface of gold nanostructures. *Acs Nano*, 6(1), 512-522. doi:10.1021/nn2038516
- Xu, J., Ji, J., Chen, W., & Shen, J. (2005). Novel biomimetic polymersomes as polymer therapeutics for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 107(3), 502-512. doi:10.1016/j.jconrel.2005.06.013
- Xu, Q., Hashimoto, M., Dang, T., Hoare, T., Kohane, D., Whitesides, G., . . . Anderson, D. (2009). Preparation of monodisperse biodegradable polymer microparticles using a microfluidic flow-focusing device for controlled drug delivery. *Small*, 5(13), 1575-1581. doi:10.1002/smll.200801855
- Yang, K., & Ma, Y. (2010). Computer simulation of the translocation of nanoparticles with different shapes across a lipid bilayer. *Nature Nanotechnology*, 5(8), 579-583. doi:10.1038/NNANO.2010.141
- Yang, W., Peters, J., & Williams, R. (2008). Inhaled nanoparticles - A current review. *International Journal of Pharmaceutics*, 356(1-2), 239-247. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.02.011
- Yasukawa, T., Ogura, Y., Tabata, Y., Kimura, H., Wiedemann, P., & Honda, Y. (2004). Drug delivery systems for vitreoretinal diseases. *Progress in Retinal and Eye Research*, 23(3), 253-281. doi:10.1016/j.preteyeres.2004.02.003
- Ye, M., Kim, S., & Park, K. (2010). Issues in long-term protein delivery using biodegradable microparticles. *Journal of Controlled Release*, 146(2), 241-260. doi:10.1016/j.jconrel.2010.05.011
- Yoo, H., & Park, T. (2004). Folate receptor targeted biodegradable polymeric doxorubicin micelles. *Journal of Controlled Release*, 96(2), 273-283. doi:10.1016/j.jconrel.2004.02.003
- Yoon, D., Chu, D., Ng, C., Pham, E., Mason, A., Hudson, D., . . . Kamei, D. (2009). Genetically engineering transferrin to improve its in vitro ability to deliver cytotoxins. *Journal of Controlled Release*, 133(3), 178-184. doi:10.1016/j.jconrel.2008.10.006

- Yoshida, R., & Okano, T. (2010). Stimuli-responsive hydrogels and their application to functional materials. In R. M. Ottenbrite, K. Park & T. Okano (Eds.), *Biomedical applications of hydrogels handbook* (pp. 19-44). New York: Springer.
- Yu, B., Tai, H., Xue, W., Lee, L., & Lee, R. (2010). Receptor-targeted nanocarriers for therapeutic delivery to cancer. *Molecular Membrane Biology*, 27(7), 286-298. doi:10.3109/09687688.2010.521200
- Zha, L., Banik, B., & Alexis, F. (2011). Stimulus responsive nanogels for drug delivery. *Soft Matter*, 7(13), 5908-5916. doi:10.1039/c0sm01307b
- Zhang, L., Yang, M., Wang, Q., Li, Y., Guo, R., Jiang, X., . . . Liu, B. (2007). 10-hydroxycamptothecin loaded nanoparticles: Preparation and antitumor activity in mice. *Journal of Controlled Release*, 119(2), 153-162. doi:10.1016/j.jconrel.2007.02.013
- Zhao, G., & Rodriguez, B. (2013). Molecular targeting of liposomal nanoparticles to tumor microenvironment. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 61-71. doi:10.2147/IJN.S37859
- Zhao, H., & Yung, L. (2008). Selectivity of folate conjugated polymer micelles against different tumor cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 349(1-2), 256-268. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.07.040
- Zuñiga, J. M., Tur Marí, J. A., Milocco, S. N., & Piñeiro, R. (2001). *Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana.